

Intrazelluläre Reninprozessierung

DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften

(Dr. rer.nat.) der Naturwissenschaftlichen Fakultät III

– Biologie und Vorklinische Medizin –

der Universität Regensburg



vorgelegt von

Birgit Klar, geb.Obermayer

Wuppertal, Juni 2010

Die vorliegende Arbeit entstand in der Zeit von August 2003 bis Juni 2007 unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. A. Kurtz am Lehrstuhl für Physiologie I der Universität Regensburg.

Das Promotionsgesuch wurde eingereicht am: 16. Juni 2010

Prüfungsausschuss:

Vorsitzender:	Prof. Dr. Schweda
1. Prüfer (1.Gutachter)	Prof. Dr. Kurtz
2. Prüfer (2.Gutachter)	Prof. Dr. Witzgall
3. Prüfer	Prof. Dr. Göpferich
Ersatzprüfer	Prof. Dr. Minuth

Inhaltsverzeichnis

I	Einleitung	8
1	Das Renin- Angiotensin- Aldosteron- System (RAAS)	8
1.1	Die juxtaglomeruläre Zelle	10
1.2	Regulation der Reninsynthese und -sekretion	11
1.3	Murine Reninprozessierung	14
1.3.1	Das Reningen	14
1.3.2	Das Reninprotein	15
1.3.3	Die Reninsekretion.....	17
1.4	As4.1 Zellen	18
1.5	Optische Methoden zur Aufklärung intrazellulärer Abläufe und Exozytose Ereignisse in der lebenden Zelle	19
1.6	Green Fluorescent Protein (GFP)	19
1.7	Zielsetzung der Arbeit	21
II	Material und Methoden	24
1	Material	24
1.1	Organismen, Eukaryontische Zelllinien und Versuchstiere	24
1.2	Oligonukleotide und Plasmide.....	24
1.3	Antikörper.....	26
1.4	Medien, Puffer und Lösungen	27
1.5	Chemikalien, Enzyme und kommerzielle Kits	31
1.6	Verbrauchsmaterial und Geräte	34
1.7	Internetdienste und Software	36
2	Methoden	37
2.1	Tierhaltung und Kultivierung eukaryontischer Zellkulturen bzw. Organismen	37
2.1.1	Tierhaltung.....	37
2.1.2	Anzucht und Kultivierung der As4.1 Zellen	37
2.1.3	Kultivierung der E.coli Bakterien	38
2.2	Gentechnische Methoden	38
2.2.1	Transformation von E.coli	38
2.2.2	Transfektion von As4.1 Zellen	38

2.3	Isolierung und Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren.....	39
2.3.1	Isolierung genomischer DNA aus Mäuseschwänzen	39
2.3.2	Isolierung Plasmid- DNA aus <i>E.coli</i>	39
2.3.3	Isolierung der Gesamtribonukleinsäure aus Zellen	40
2.3.4	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren.....	41
2.4	RNAse- Protection Assay.....	41
2.5	PCR Reaktionen	42
2.5.1	Reverse Transkription.....	42
2.5.2	Polymerasekettenreaktion	43
2.5.3	Quantitative Polymerasekettenreaktion	44
2.6	Plasmidgenerierung	44
2.6.1	Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA- Fragmenten	44
2.6.2	Aufreinigung von DNA	44
2.6.3	Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen	44
2.6.4	Ligation von DNA-Fragmenten	45
2.6.5	DNA-Sequenzanalyse.....	45
2.7	Proteinbiochemische Methoden.....	45
2.7.1	Proteinextrakt aus As4.1 Zellen	45
2.7.2	Proteinbestimmung.....	45
2.7.3	Auftrennung von Proteinen	46
2.7.4	Western Blot Analyse.....	46
2.8	Bestimmung des Reningehalts	46
2.8.1	Zellkultur	46
2.8.2	Gewebe	47
2.8.3	Plasma.....	47
2.9	Isoliert perfundierte Niere.....	48
2.10	Zellfärbungen	49
2.10.1	Lebendfärbung.....	49
2.10.2	HRP- Färbung.....	49
2.11	Durchlicht- und Konfokalmikroskopie.....	50
2.12	Durchflusszytometrie (Fluorescence Activated Cell Sorting).....	50
2.13	Statistik	51
III	Ergebnisse.....	52

1	Charakterisierung der REN1 - und REN2- Mäuse.....	52
1.1	Bestimmung des aktiven Plasminogen53	53
1.2	Quantifizierung der Renin1 bzw. Renin2 mRNA der Niere.....	55
1.3	Weitere in vivo Befunde	58
1.3.1	Chronische Stimulation des RAAS	58
1.3.2	Akute Stimulation des RAAS	62
1.4	Reninfreisetzung aus der isoliert perfundierten Niere (ex- vivo).....	64
1.4.1	Effekt von Isoproterenol [10nM] auf die Reninsekretion.....	65
2	Untersuchung der Reninprozessierung auf zellulärer Ebene (in vitro) ...	67
2.1	Konstrukte.....	68
2.1.1	Transfektionseffizienz und Fluoreszenzintensität	69
2.1.2	Biochemischer Nachweis der Fusionsproteine	72
2.1.3	Intrazelluläre Lokalisation des Renins.....	76
2.2	Förderung der Reninvesikelbildung in As4.1 Zellen.....	82
2.2.1	Zellzyklusinhibitoren: Roscovitin und Olomoucine	82
2.2.2	Auswirkung von Olomoucine auf die Reningenexpression	84
2.2.3	Verhältnis von Renin/Prorenin in Olomoucine behandelten As4.1 Zellen	87
2.2.4	Auswirkung von Olomoucine auf die Reninvesikelbildung	89
2.2.5	Auswirkungen von Olomoucine auf die Reninvesikelbildung in transfizierten Zellen.....	94
IV	Diskussion	96
1	Charakterisierung des murinen in- vivo Modells.....	96
2	Etablierung eines in vitro Systems	103
2.1	Konstrukte.....	104
2.2	Begünstigen der Reninvesikelbildung	106
V	Zusammenfassung	110
VI	Literaturverzeichnis.....	112
VII	Anhang.....	120
1	Abkürzungsverzeichnis	120
2	Publikationen.....	122
3	Danksagung	123
4	Eidesstattliche Erklärung.....	124

I Einleitung

1 Das Renin- Angiotensin- Aldosteron- System (RAAS)

Das Renin- Angiotensin- Aldosteron- System spielt eine wesentliche Rolle bei der Blutdruckregulation sowie bei der Aufrechterhaltung des Wasser- und Salzhaushaltes des Körpers. Defekte innerhalb dieses Systems führen oftmals zu kardiovaskulären und renalen Erkrankungen. Daher steht das RAAS nunmehr seit hundert Jahren im Fokus der Wissenschaft. Von besonderem Interesse ist dabei Renin, da die Aktivität des RAAS unter physiologischen Bedingungen vor allem von der Reninkonzentration im Blut abhängt (Kurtz, 1989).

Die Aspartyl- Protease Renin stellt das Schlüsselenzym der RAAS Signalkaskade dar. Es katalysiert die Abspaltung des biologisch inaktiven Dekapeptids Angiotensin I von Angiotensinogen, einem von der Leber in das Blutplasma sezernierten Glykoprotein. Das Angiotensin I- Converting Enzyme (ACE), eine Dipeptidyl- Protease, überführt Angiotensin I in das Oktapeptid Angiotensin II. Angiotensin II wiederum stellt den eigentlichen biologischen Effektor des Systems dar. Es wirkt stark vasokonstriktorisch und führt in den Nebennieren zu der Synthese und Ausschüttung des Steroidhormons Aldosteron. Sowohl Aldosteron als auch Angiotensin II führen in der Niere zu einer verstärkten Rückresorption von Kochsalz und Wasser und erhöhen dadurch Blutdruck und Blutvolumen (Hackenthal et al., 1990). Da weder die Konzentration von Angiotensinogen noch die des Angiotensin I- Converting- Enzyms (ACE) limitierend für die Bildung von Angiotensin II sind, wird die Aktivität des RAAS hauptsächlich durch die Reninsekretionsrate gesteuert (Kurtz, 1989)

Das Renin- Angiotensin- Aldosteron- System wird durch einen negativ Feedback Mechanismus reguliert, da erhöhte Kochsalzkonzentration sowie erhöhter Blutdruck, der einen erhöhten renalen Perfusionsdruck bedingt, aber auch Angiotensin II direkt einen hemmenden Effekt auf die Reninsynthese und Reninsekretion ausüben (Hackenthal et al., 1990).

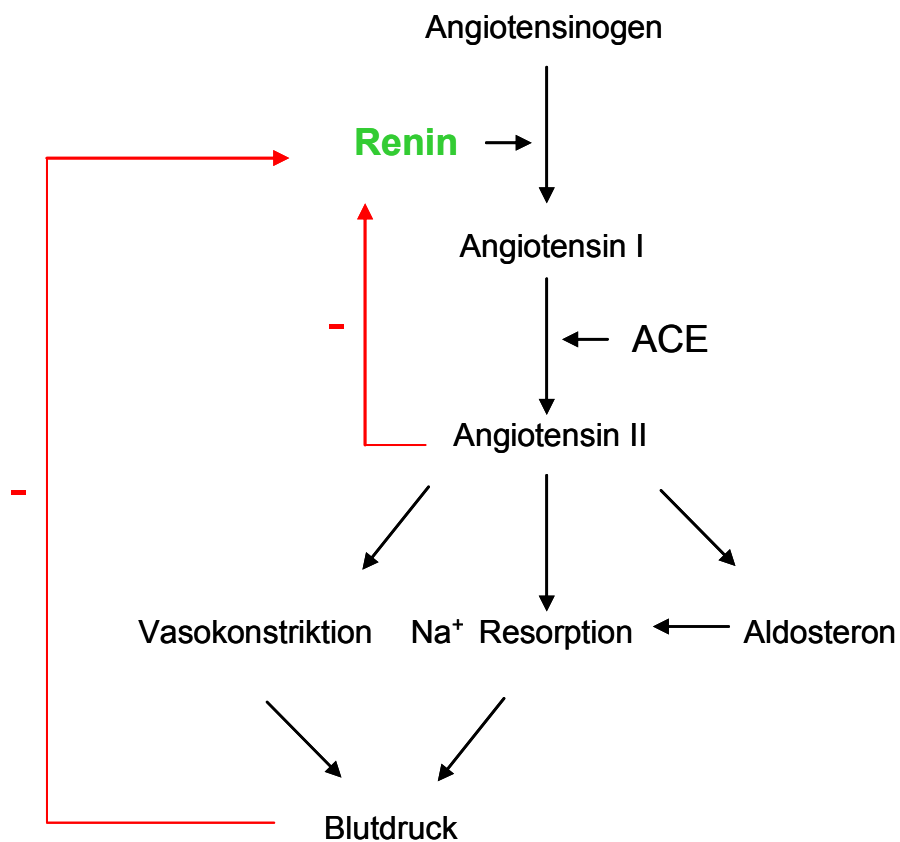


Abb. 1-1: Schematische Darstellung der Signalkaskade des Renin-Angiotensin- Aldosteron- Systems

1.1 Die juxtaglomeruläre Zelle

Renin wird in der Niere von juxtaglomerulären (JG-) Zellen gebildet und sezerniert. Die JG- Zellen sind, als Teil des juxtaglomerulären Apparates, in der Media- Schicht der afferenten Arteriole lokalisiert und stehen mit den Macula Densa Zellen des distalen Tubulus in Verbindung (Taugner et al., 1984a).

Die Zahl der Renin bildenden Zellen ist in der Niere nicht konstant, sondern spiegelt den jeweiligen Stimulationszustand des Reninsystems wieder. Bei chronischer Stimulierung des Reninsystems kann durch Rekrutierung glatter Muskelzellen in der afferenten Arteriole die Zahl der JG- Zellen durch metaplastische Transformation erhöht bzw. bei dauernder Unterdrückung des Systems durch Umwandlung in glatte Muskelzellen ihre Zahl erniedrigt werden (Taugner et al., 1984a; Taugner et al., 1984b; Barajas, 1979). Dabei kann eine retrograde Rekrutierung der Zellen in den afferenten Arteriolen bis hin zu größeren Arterien stattfinden (Fuchs et al., 2002). Die zellulären Mechanismen, die zu dieser Rekrutierung und Transformation der Zellen beitragen, sind bislang weitgehend unverstanden.

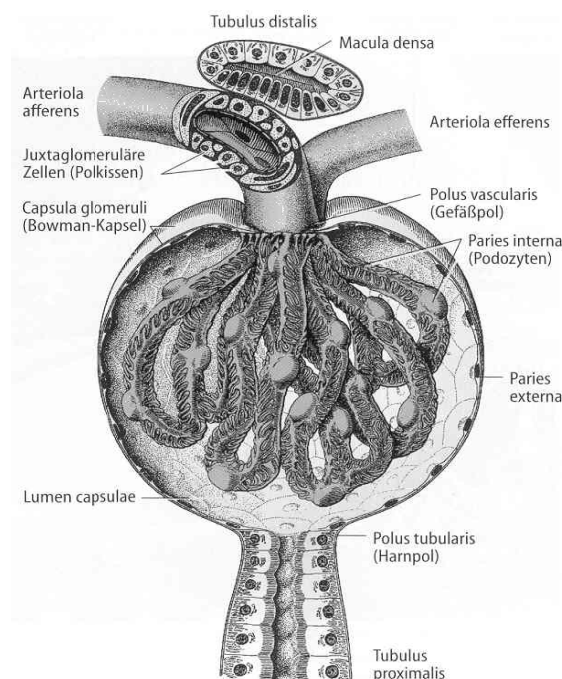


Abb.1-2: Schematische Darstellung eines Glomerulus (Junqueira 2002)

1.2 Regulation der Reninsynthese und -sekretion

Es werden vier grundlegende Mechanismen, die unter normalen physiologischen Bedingungen die Freisetzung von Renin in der Niere kontrollieren, beschrieben (Davis and Freeman, 1976) (Wagner and Kurtz, 1998). Dazu zählen der systemische Blutdruck bzw. renale Perfusionsdruck, der Salzhaushalt des Körpers, die Aktivität des sympathischen Nervensystems und eine Reihe humoraler und lokal sezernierter Faktoren.

Ein Abfall des systemischen Blutdrucks im Körper führt in der Niere zu einem vermindertem renalen Perfusionsdruck was zu einem Anstieg der Reninsekretion und damit einer erhöhten Reninkonzentration im Plasma führt. Für die Übermittlung des Signals ist der renale Barorezeptor verantwortlich (Davis and Freeman, 1976; Davis and Freeman, 1976; Scholz et al., 1994). Es wird vermutet, dass die Wandspannung der Gefäße durch den intraluminalen Druck verändert wird, was eine Änderung des Membranpotentials der JG-Zellen zur Folge hat und so die Reninsekretion beeinflusst (Carey et al., 1997; Lush and Fray, 1984).

Die Regulation der Reninsekretion durch den Blutdruck kann jedoch nicht vollständig getrennt von der Regulation durch den Salzhaushalt des Körpers betrachtet werden, da eine Erhöhung des Blutdrucks auch zu einer erhöhten Beladung des distalen Tubulus mit Na^+ und Cl^- führt. Gesteigerte Kochsalzaufnahme führt dem entsprechend zu einer Hemmung des Reninsystems, eine verminderte Aufnahme von NaCl hingegen zu einer Stimulation der Reninsynthese und -sekretion. Die Macula Densa fungiert dabei als Sensor für die Chloridkonzentration der Tubulusflüssigkeit (Schlatter et al., 1989; Schnermann et al., 1998; Vander, 1967). Die weitere Signalübertragung von den Macula Densa Zellen hin zu den juxtaglomerulären Zellen erfolgt über die Mediatoren Adenosin (Schweda et al., 2003), Stickstoffmonoxid (Castrop et al., 2004b) sowie die Prostaglandine (Schweda et al., 2004). Eine weitere Rolle der Macula Densa Region ist die Übermittlung eines negativen Feedback Mechanismus zwischen dem Perfusionsdruck in der

afferenten Arteriole und der glomerulären Filtrationsrate (TGF). (Castrop et al., 2004a).

Das sympathische Nervensystem ist ebenfalls ein starker Stimulator des Reninsystems. Die Innervierung der JG- Zellen führt über β_1 - adrenerge Rezeptoren zu einer Aktivierung des cAMP Signalweges und damit zu einer Stimulation der Reninsekretion (Davis and Freeman, 1976; Keeton and Campbell, 1980). Voraussetzung dabei ist die direkte Nachbarschaft der Katecholamin sezernierenden Zellen zum juxtaglomerulären Apparat (Wagner et al., 1999; Holmer et al., 1997)

Neben den systemisch wirkenden Effektoren, sind auch noch zahlreiche andere lokal wirkende Substanzen bekannt, die die Reninsekretion und Reninsynthese beeinflussen. Stimulatoren des RAAS sind z.B. Bradykinin, das Calcitonin gene related peptide, Dopamin und Adrenomedullin, (Keeton and Campbell, 1980; Kurtz, 1989; Kurtz et al., 1988b; Jensen et al., 1997). Hemmenden Einfluss auf das RAAS hingegen haben Substanzen wie z.B. Adenosin, Vasopressin, Platelet activating factor (PAF), Interleukin- 1β , Endothelin, Tumor Necrosis Faktor alpha (TNF- α) und sehr wahrscheinlich auch der Transforming Growth Faktor β (TGF- β II) (Keeton and Campbell, 1980; Kurtz et al., 1988a; Pfeilschifter et al., 1985; Petrovic et al., 1997; Scholz et al., 1995; Todorov et al., 2002; Pietri et al., 2002). Eine zentrale Rolle nimmt Angiotensin II ein (Campbell, 1996).

Auf der zellulären Ebene sind klassische second Messenger Systeme, wie cAMP, cGMP und Kalzium für die Regulation der Reninsynthese und –sekretion verantwortlich.

Ein Anstieg des cAMP- Spiegels spielt eine zentrale stimulatorische Rolle für die Reninsynthese und Sekretion (Hackenthal et al., 1990; Kurtz and Wagner, 1999; Friis et al., 1999). Die Erhöhung der intrazellulären cAMP Konzentration erfolgt dabei über eine Rezeptorvermittelte Aktivierung der Adenylatzyklase bedingt durch humorale oder lokal sezernierte Faktoren. Zudem sind die cAMP hydrolysierenden Phosphodiesterasen, speziell die Isoformen PDE-3 und PDE-

4 (Beavo, 1995) an der Kontrolle des cAMP- Spiegels beteiligt und somit auch an der Reninsekretion (Kurtz, 1989; Chiu and Reid, 1996; Kurtz et al., 1998)

Die Beteiligung des second messenger cGMP an der Regulation der Reninsekretion wird noch kontrovers diskutiert. Eine Aktivierung der Guanylatzyklase durch das endotheliale Stickstoffmonoxid (NO) bzw. durch das Atriale Natriuretische Peptid (ANP) und die daraus resultierende erhöhte cGMP-Konzentration wirkt in vivo und in vitro konzentrationsabhängig auf die Reninsekretion. Dies geschieht stimulatorisch, über eine Beteiligung am cAMP-Signalweg (Kurtz et al., 1998; Friis et al., 2002) oder inhibitorisch, durch die Aktivierung der cGMP abhängigen Proteinkinase II (Kurtz and Wagner, 1998; Wagner et al., 1998).

Der Einfluss des intrazelluläres Ca^{2+} auf die Reninsekretion der JG- Zellen wird als „Kalzium Paradoxon bezeichnet, da hier ein Abfall der Ca^{2+} - Konzentration die regulierte Reninfreisetzung fördert. Hormone, die wie Angiotensin II, Endothelin oder Vasopressin über die Phospholipase C einen intrazellulären Ca^{2+} Anstieg und eine Aktivierung der PKC verursachen, hemmen dementsprechend die Reninsekretion (Kurtz et al., 1986; Hackenthal et al., 1990; Ritthaler et al., 1995; Muller et al., 2002). Die cytosolische Kalziumkonzentration wirkt mittels der Kalzium- inhibierten Adenylatzyklen AC5 und AC6 auf den cytosolischen cAMP Spiegel (Grunberger et al., 2006; Ortiz-Capisano et al., 2007). Des Weiteren verursacht ein extrazellulärer Abfall der Kalziumkonzentration ebenfalls eine Hemmung der Reninsekretion (Schweda and Kurtz, 2004).

1.3 Murine Reninprozessierung

1.3.1 Das Reningen

Das Reningen wurde bereits in vielen Säugetierspezies charakterisiert. Bei Ratte und Maus besteht es jeweils aus 9 Exons unterbrochen von 8 Intronsequenzen. Beim Menschen hingegen existiert ein zusätzliches 9bp Fragment, das als Exon 5A bezeichnet wird. Daher ergibt sich ein Aufbau für das humane Reningen aus 10 Exons und 9 Introns. Ratte und Mensch besitzen jeweils ausschließlich ein Reningen. Die Spezies Maus hingegen grenzt sich von diesen durch eine innerartliche Besonderheit ab da einige Mäusestämme zwei Reninloci, REN- 1^d und REN- 2 besitzen, und andere nur einen, REN- 1^c (Morris, 1992). Bei beiden Genotypen liegen die Reningene auf dem Chromosom 1 (Chirgwin et al., 1984) und es gilt als sicher, dass das REN- 2 Gen während der Evolution vermutlich vor 2,8- 5,5 Millionen Jahren durch Duplikation von REN-1 entstanden ist (Holm et al., 1984).

Die höchste Expression des Reningens findet sich bei allen bisher untersuchten Säugetieren in der Niere und dort ausschließlich in den JG- Zellen. Eine geringere Expression des Reningens wurde allerdings auch für weitere Gewebetypen wie Gehirn, Herz, Nebenniere und Lunge beschrieben, wobei es dort eine wichtige physiologische Funktion in der Aufrechterhaltung des so genannten lokalen organspezifischen Renin- Angiotensin Systems ausübt (Morris, 1992; Phillips et al., 1993; Campbell, 1987).

Ausnahme bilden die oben genannten Mäusestämme, welche zusätzlich das REN-2 Gen tragen welches vorrangig in der Speicheldrüse exprimiert wird (Kon and Endoh, 1999).

Die auffälligste Eigenschaft der Reningentranskription ist die starke Induzierbarkeit durch cAMP, welches wohl den wichtigsten intrazellulären Regulator der Reningenexpression darstellt.

1.3.2 Das Reninprotein

Renales Renin wird in den JG- Zellen als Preprorenin (402As) transkribiert und translatiert (Barajas, 1979; Taugner et al., 1984b). Nach der Transkription und Prozessierung der mRNA findet die Translation unter gleichzeitiger Translokation in das rauhe Endoplasmatische Retikulum (rER) statt. Dabei wird das Signalpeptid durch eine Signalpeptidase abgespalten, so dass die enzymatisch inaktive Vorläuferform Prorenin entsteht (Hackenthal et al., 1990; Morris, 1992; Tamura et al., 1995). Während Ren1^c und Ren1^d Genprodukte nach der Translation in ihrer Aminosäuresequenz drei potentielle N-Glykosylierungstellen aufweisen, Asn69, Asn139 und Asn320, fehlen diese dem Renin2 Protein (Sigmund and Gross, 1991). Faust et al. konnten 1987 (Faust et al., 1987) an humanem Renin zeigen, dass neben der Glykosylierung des Renin1 sogar eine Phosphorylierung von Mannoseresten stattfindet. Dies ist das klassische Signal für den intrazellulären Transport von Proteinen, deren Ziel das Lysosom ist. Nach der Prozessierung des Prorenins durch rER, cis-Golgi- Netzwerk und Golgi- Stapel und damit eventuell verbundener weiterer posttranslationaler Modifikationen, entscheidet sich im so genannten trans-Golgi- Netzwerk (TGN) der weitere Weg des Prorenins. Es werden bislang drei potentielle Wege (Abb. 1-3) in der Niere diskutiert: konstitutiv sekretorisch, basal oder reguliert sekretorisch (Morris, 1992; Reudelhuber et al., 1995). Auf dem konstitutiv sekretorischen und basalem Weg wird Prorenin ausgeschleust. Für die Regulation des Renin- Angiotensin- Aldosteron- Systems ist jedoch der Weg der regulatorischen Sekretion der wichtigste, da hier sowohl die Reifung des inaktiven Prorenins zum aktiven Enzym als auch die Speicherung und die gezielte Freisetzung von enzymatisch aktivem Renin ermöglicht wird.

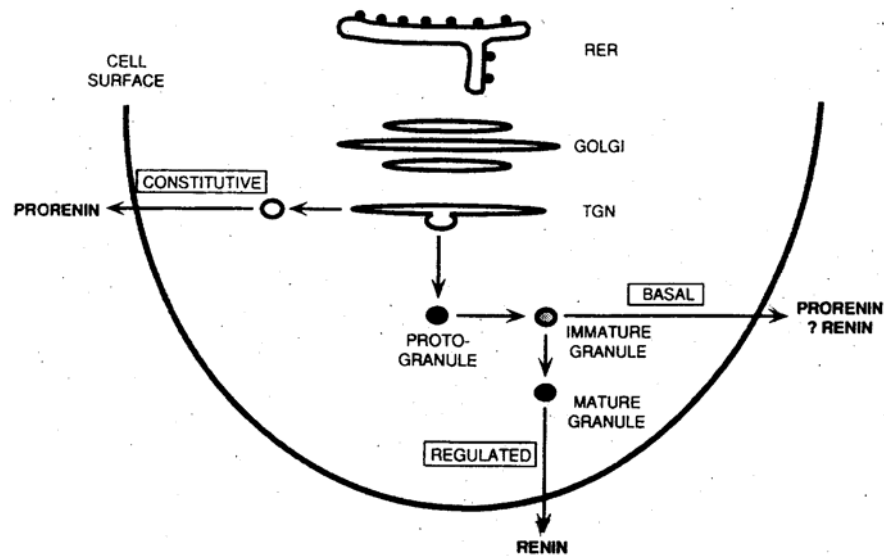


Abb.1-3: Schematische Darstellung potentieller Sekretionswege in juxtaglomerulären Zellen (Reudelhuber et al., 1995)

Die „Reifung“ des Proteins erfolgt durch N- terminales Abspalten der Prosequenz durch noch nicht genauer identifizierte Enzyme (Catanzaro et al., 1983; Dzau et al., 1988; Panthier et al., 1982) (Hirose et al., 1985). Durch mikroskopische Untersuchung immunohistochemischer Schnitte eines juxtaglomerulären Apparates einer 5 Tage alten Maus, konnten die verschiedenen Entwicklungsstufen der Prorenin bzw. später Renin enthaltenden, granulären Vesikel ähnlichen Strukturen detektiert werden (Reudelhuber et al., 1995). Taugner et al. konnten 1986 zudem mit Hilfe von spezifischen Antikörper zeigen, dass die Strukturen die sich vom TGN abschnüren nur Prorenin enthalten, während in den reifen Granulen ausschließlich Renin gefunden werden konnte (Taugner et al., 1986a). Des Weiteren konnte auf immunologischem Wege gezeigt werden, dass es sich bei diesen Granulen vermutlich um Lysosom ähnliche Strukturen handelt, die für Prozessierung, Speicherung und Sekretion des Renins rekrutiert wurden. Die reifen Reninvesikel enthielten dabei neben Renin typische lysosomale Proteine

(Taugner and Metz, 1986; Taugner et al., 1986b; Taugner and Hackenthal, 1988).

In vivo konnte 1997 von Clark et al gezeigt werden (Clark et al., 1997), dass in Mäusestämmen mit 2 Reninloci $Ren1^{-/-}$ Mäuse eine veränderten Morphologie der Macula Densa aufweisen und das Ausbilden von typischen Reningranulen komplett unterbleibt. Was zu dem Schluss führte, dass für die Formation von Speichergranulen, auch in Anwesenheit von unglykosyliertem Renin2, das Ren1 Protein unerlässlich ist und das Renin1 und Renin2 die JG- Zellen auf Grund ihres Glykosylierungs- Zustandes auf unterschiedlichen sekretorischen Wegen verlassen müssen. Ein direkter Beweis dieser Hypothese fehlt allerdings bislang.

1.3.3 Die Reninsekretion

Die Freisetzung des Renins erfolgt durch Exocytose in Quanten und nicht kontinuierlich. Sie kann sich in den JG- Zellen innerhalb weniger Minuten ändern (Skott, 1986). Des Weiteren ist die Sekretion von Renin aus den JG- Zellen gegenüber einer Osmolaritätsänderung sensitiv. Die Sekretionsrate verhält sich dabei zur extrazellulären Osmolarität indirekt proportional (Skott, 1988). Eine Erniedrigung der extrazellulären Osmolarität führt zu einem Volumenanstieg von JG- Zelle und Vesikeln. Ein Anschwellen der Vesikel wiederum fördert die Fusion mit der Plasmamembran und damit die Freisetzung von Renin. Es wird allerdings vermutet, dass nicht das Zellvolumen sondern das Vesikelvolumen allein für die Reninsekretion verantwortlich ist. Das Vesikelvolumen könnte durch den Einstrom von Kalium- und Chloridionen chemiosmotisch reguliert werden, der seinerseits wieder durch die Aktivität eines K^+/H^+ - Austauschers kontrolliert wird (King et al., 1993). Auch das Cytoskelett der JG- Zelle kann, neben dem Vesikelvolumen, die Exocytose beeinflussen. Ein unter der Plasmamembran ausgebildetes Aktin- Myosin- Netzwerk könnte als mechanischer Regulator der Reninsekretion wirken. Durch eine Aktivierung der Myosin- Leichtketten- Kinase und eine Kontraktion der JG-

Zelle würde dann dieses Netzwerk eine mechanische Barriere für die Vesikelfusion darstellen (Park et al., 1996; Ogawa et al., 1995).

Optische Befunde für eine Fusion der Reninvesikel mit der Plasmamembran in JG- Zellen konnte 1984 erstmals von Taugner et al. als Momentaufnahme mittels Elektronenmikroskopie gezeigt werden (Taugner et al., 1984b). Erst 2004 konnten János Peti-Peterdi und seine Mitarbeiter in vivo die Freisetzung Renins aus sekretorischen Vesikeln in „Echtzeit“ mit Hilfe der Konfokalen Mikroskopie zeigen (Peti-Peterdi et al., 2004).

1.4 As4.1 Zellen

Untersuchungen der murinen Reningentranskription oder der Reninprozessierung waren Anfang der 90er Jahren nicht leicht. Die Isolation von primären reinen JG- Zellkulturen gestaltete sich äußerst schwierig, außerdem verloren diese dann schnell die Fähigkeiten der Reningenexpression und Reninsekretion. Ein geeignetes Zellkulturmodell, das diese Defizite wettmachen könnte, fehlte bislang. Um Fragestellungen der renalen Reningentranskription oder –sekretion bearbeiten zu können wurden daher häufig Renin produzierende Zelllinien aus nicht renalem Gewebe, wie Calu-6 Zellen, benutzt oder Zelllinien, die Renin endogen nicht exprimieren, wie die AtT-20 Zellen. Diese Zellen mussten deshalb für die Untersuchung der Reningenexpression mit Reninpromotor- Reporterkonstrukten transient oder stabil transfiziert werden. Sigmund et. al gelang es 1990 eine endogen Renin produzierende Zelllinie - As4.1 – zu etablieren. Diese Zelllinie wurde aus C57Black6 Mäusen isoliert, die das SV40 Antigen unter der Kontrolle des Ren-2 Genpromotors exprimieren (Jones et al., 1997; Sigmund et al., 1990)

In weiteren Untersuchungen konnten Jones et al 1997 zeigen, dass die Biosynthese der glykosylierten Form des Renins – Renin1- in den Nierentumorzellen As4.1 erfolgreich abläuft, in dem sie das Molekulargewicht,

den Glykosylierungszustand und den N- Terminus von Prorenin bzw. - Renin näher charakterisierten.

Die Zelllinie As4.1 könnte sich aufgrund dieser Ergebnisse für die Etablierung eines Zellsystems zur Untersuchungen der Reninprozessierung eignen und sollte daher in der vorliegenden Arbeit näher charakterisiert werden.

1.5 Optische Methoden zur Aufklärung intrazellulärer Abläufe und Exozytose Ereignisse in der lebenden Zelle

Der sekretorische Weg in der Zelle wurde in der Anfangszeit klassischer Weise durch die Kombination von Elektronenmikroskopie und biochemischer und/oder genetischer Anwendungen untersucht. So konnten die großen Organellen des sekretorischen Weges wie Endoplasmatisches Retikulum und Golgi- Apparat mit Hilfe der Elektronenmikroskopie und Membranfraktionierungen definiert werden (Palade, 1975). Randy Schekman charakterisierte beispielsweise die biochemischen Grundlagen des Transports zwischen den Organellen in den Jahren danach mittels Hefegenetik und in- vitro Systemen (Schekman, 1992). Mit der Verfügbarkeit von GFP und dem Einsatz konfokaler Mikroskope wurde in den letzten 10 Jahren der Grundstein gelegt für das so genannte *live cell imaging* , das sich rasant mit seinen optischen Darstellungsmöglichkeiten weiter entwickelte und mittlerweile eine bedeutende Rolle für die Aufklärung von Fragestellungen bezüglich des sekretorischen Weges und der anschließenden Exozytosereaktion der Zelle eingenommen hat (Presley, 2005).

1.6 Green Fluorescent Protein (GFP)

GFP wurde in den frühen 60er Jahren zuerst von Shimomura und Kollegen als Partnerprotein von Aequorin in der Qualle *Aequorea victoria* entdeckt (Tsien, 1998). Der Durchbruch für die steile Karriere des GFP als Marker für die biologische „Zellbildgebung“ gelang Prasher et al 1992 (Prasher et al., 1992)

mit der Klonierung des Gens und der Tatsache, dass Chalfie et al zeigen konnten, dass die GFP Fluoreszenz Speziesunabhängig ist und keine Substrate oder Kofaktoren, außer Sauerstoff für die spontane Zyklisierung des Chromophors, benötigt (Chalfie et al., 1994). Damit gleichbedeutend ist, dass das Gen alle Informationen für die posttranslationale Synthese des Chromophors in sich trägt und keine weiteren Quallenspezifischen Enzyme etc. notwendig sind, was wiederum eine Expression in artfremden Spezies erst ermöglicht. Daher sind die Einsatzmöglichkeiten für GFP sehr vielfältig und breit gefächert.

Das Anregungsoptimum des Wildtyp GFP liegt bei 470– 475nm, das Optimum des Emmissionsspektrums bei 504nm (JOHNSON et al., 1962). Als Fusionsprotein konnte es bereits in alle größeren Zellorganellen, wie Mitochondrien, Endoplasmatisches Retikulum, Golgi- Apparat, Peroxisomen, Lysosomen, etc., aber auch in sekretorische Vesikel verschickt werden. Viele unterschiedliche Proteine wurde sowohl N- terminal als auch C- terminal in frame mit GFP fusioniert (Tsien, 1998). Einige Beispiele für GFP als N-terminaler Tag wären das Mikrotubuli- Assoziierte- Protein 4 der Maus, GFP-MAP4 (Olsen et al., 1995), oder der KDEL- Rezeptor, der an das Retentionssignal ER -ansässiger Proteine bindet, GFP- KDELr (Cole et al., 1995). Auch für die Fusion mit dem Carboxyterminus der Proteine gibt es zahlreiche Beispiele wie den Glucocorticoidrezeptor der Ratte, nuGFP, oder humanes Chromogranin B, hCgB-GFP (Kaether und Gerdes, 1995).

Neben dem zuerst beschriebenen und allgemein als wt bezeichneten GFP stehen heute eine Vielzahl von Mutanten mit klar verbesserten biochemischen und spektralen Eigenschaften zur Verfügung.

Im Zuge dieser Arbeit wurde das so genannte **Enhanced GFP** eingesetzt. Der verwendete Vektor pEGFP-N1 kodiert dabei für eine Variante des wt GFPs (*GFPmut1Variante4*), die durch die Optimierungsmaßnahmen für eine stärkere Fluoreszenz und eine höhere Expressionsrate in tierischen Zellen steht (Cormack et al., 1996). Die Anregungswellenlänge wurde dabei hin zum länger welligen Spektralbereich verschoben und liegt jetzt bei 488nm, während das Emissionsoptimum bei 507nm zu finden ist.

1.7 Zielsetzung der Arbeit

Das Ziel der vorliegenden Arbeit lässt sich in drei große Hauptpunkte unterteilen:

1) Zuerst soll durch das gezielte Verpaaren von Ren1^d-GFP und C57/BL6 Mäusen ein in- vivo System geschaffen werden mit dessen Hilfe der direkte Vergleich von glykosyliertem (Renin1) und unglykosyliertem Renin (Renin2) vor einem gemeinsamen genetischen Hintergrund möglich wird. In diesen Mäusen soll anschließend die regulierte Freisetzung aktiven Renins, in Abhängigkeit vom jeweiligen Glykosylierungszustand, untersucht werden. Dabei soll eine chronische Stimulation des Renin- Angiotensin- Aldosteron- Systems (RAAS) durch den Einsatz von ACE- Inhibitoren in Kombination mit einer Niedrigsalz-Diät und eine akute Stimulation durch den Einsatz des Schleifendiuretikums Furosemid in den Tieren erreicht werden. Die daraus resultierende Konzentration aktiven Renins im Blutplasma soll anschließend quantifiziert werden.

In einem parallelen Versuchsansatz soll durch die Quantifizierung der jeweiligen Renin mRNA untersucht werden, ob eine Änderung des aktiven Reninplasmaspiegels durch die chronische bzw. akute Stimulation des RAAS eine Folge veränderter Renin mRNA Transkription ist oder auf einer unterschiedlichen endogenen Aktivierung des Renins beruht.

In weiterführenden Experimenten soll abschließend geklärt werden inwiefern das aktive Renin im Plasma der Tiere tatsächlich aus der Niere stammt. Hierzu soll anhand der isoliert perfundierten Niere (iPN), und damit unter Ausschluss systemischer Faktoren, erneut die Freisetzung aktiven Renins, diesmal unter bekannten cAMP- Stimulationsmanövern, charakterisiert werden.

Um die Ergebnisse aus den vorangegangenen in- vivo Versuchsansätzen zukünftig zellulär genauer charakterisieren zu können soll ein geeignetes in-vitro System etabliert werden. In der vorliegenden Arbeit dient als Ausgangszellkultur die murine Zelllinie As4.1, bei der es sich um immortalisierte juxtaglomeruläre Zellen handelt.

2) Zunächst sollen verschiedene murine ReninEGFP Konstrukte generiert werden, mit deren Hilfe später die Bedeutung der Glykosylierungsstellen einzeln oder in Kombination charakterisiert werden können und auch die Rolle der Prosequenz für den Ablauf der Reninprozessierung gezeigt werden kann. Es muss daher zunächst geklärt werden, ob die Transfektion der Konstrukte in As4.1 Zellkultur reproduzierbar möglich ist und ob es dabei Unterschiede in der Transfektionseffizienz der jeweiligen Konstrukte gibt. Eine weitere Voraussetzung stellt die gleich bleibende Fluoreszenzintensität der jeweiligen Fusionsproteine dar. Für vergleichende optische Untersuchungen muss gewährleistet sein, dass diese sich durch die eingeführten Mutationen nicht voneinander unterscheiden um damit Fehlinterpretationen zu vermeiden. Diese beiden Punkte sollen mittels Durchflusszytometrie untersucht werden. Ein weiterer wichtiger Aspekt ist der biochemische Nachweis der Fusionsproteine. Es soll experimentell ermittelt werden, ob und unter welchen Voraussetzungen in Zelllysaten und –überstand transfizierter Zellen dies ermöglicht werden kann. Eine abschließende Voraussetzung an ein funktionierendes in- vitro System stellt die optische Lokalisierbarkeit der Fusionsproteine in der Zelle dar. Dazu soll mit Hilfe der konfokalen Mikroskopie zunächst die Möglichkeit der Ren1EGFP Darstellung in lebenden Zellen untersucht und bewertet werden.

3) Die strukturellen Eigenschaften der Zelle spielen an dieser Stelle eine entscheidende Rolle. Daher soll im Zuge dieser Arbeit die nicht ganz optimale Reninvesikelbildung in den As4.1- Zellen positiv beeinflusst werden.

Die Ausgangshypothese ist dabei, dass die Bildung der Reningranulen durch ein Verlangsamen oder ein Arretieren der Zellteilung positiv beeinflusst werden könnte. Daher soll überprüft werden, ob durch den Einsatz von Zellzyklusinhibitoren dies erreicht werden kann. Im Vorfeld muss dabei ermittelt werden, wie sich der Einsatz der Zellzyklusinhibitoren auf die Zellen auswirkt. Dies soll zum einen durch Expressionsanalysen der CyclinA2 mRNA und der Renin mRNA Abundanz erfolgen. Dabei spielt vor allem das Erhalten der Reningenregulation durch bekannte Manöver eine entscheidende Rolle. Zum anderen sollen die Auswirkungen auf Proteinebene durch Analysen der Reninaktivität in Zelllysaten und -überstand untersucht werden. Nach Bewerten

der Ergebnisse soll dann gegebenenfalls die Transfektion des Ren1EGFP Konstruktes unter den als optimal eingestuften Bedingungen charakterisiert werden.

II Material und Methoden

1 Material

1.1 Organismen, Eukaryontische Zelllinien und Versuchstiere

Bakterien:

E. coli JM 109 (Promega)

Eukaryontische Zelllinie:

As4.1 (Type Culture Collection ATCC No. CRL 2193)

Versuchstiere:

C57/BL6 Mäuse (Charles River Sulzfeld (D))

Ren1^d-GFP Maus (Ellen S. Pentz et al., 2001)

Nachkommen der Kreuzungen zwischen: *C57/BL6* und *Ren1^{d/-}-GFP* Tieren (Eigene Arbeit)

1.2 Oligonukleotide und Plasmide

Oligonukleotide

Name	Sequenz	Verwendung
Klar 58	5'atgaagggggtgtctgtggggtc'3	PCR Renin sense
Klar 59	5'atgcgggggagggtgggcacctg'3	PCR Renin antisense
Klar 262	5'cgggatccccgccctaggcaccagggtg'3	PCR Aktin sense
Klar263	5'ggaattcggctggggtgtgaagggtctcaa'3	PCR Aktin antisense
Klar 377	5'gaaggagagcaaaaggtgaagag'3	Genotypisierung sense (Renin1 Promotor)
Klar 378	5'gtagtagaagggggagttgtg'3	Genotypisierung antisense Renin1 Intron

Klar 379	5'gccgatgggggtgttctg'3	Genotypisierung antisense GFP
Klar 489	5'gcagcagaagccaag'3	PCR Cyclin A2 sense
Klar 490	5'cagggcatcttcacac'3	PCR Cyclin A2 antisense

Plasmide

Name	Beschreibung	Referenz
pRenEGFP OB5	Präprorenin (Klar 228/229) carboxyterminal in frame mit EGFP in pEGFP-N1 kloniert.	Eigene Diplomarbeit: Identifizierung und Charakterisierung muriner Reninkomplexe; LST Prof. Kurtz; Juni 2003
pRenEGFP Asn69	wie pRenEGFP OB5; ; Mutation der N-Glykosylierungsstelle Asn69	Diplomarbeit
pRenEGFP Asn139	wie pRenEGFP OB5; Mutation der N-Glykosylierungsstelle Asn139	Diplomarbeit
pRenEGFP Asn320	wie pRenEGFP OB5; Mutation der N-Glykosylierungsstelle Asn320	Diplomarbeit
pRenEGFP Asn69/320	wie pRenEGFP OB5; Mutation der N-Glykosylierungsstellen Asn69 und Asn320	Diplomarbeit
pRenEGFP Asn139/69	wie pRenEGFP OB5, Mutation der N-Glykosylierungsstellen Asn139 und Asn69	Diplomarbeit

pRenEGFP Asn139/320	wie prenEGFP OB5; Mutation der N-Glykosylierungsstellen Asn139 und Asn320	Diplomarbeit
pRenEGFP Asn139/320/69	wie prenEGFP OB5; Mutation der N-Glykosylierungsstellen Asn139,Asn320 und Asn 69	Diplomarbeit
pRenEGFP PräII	wie prenEGFP OB5; Deletion der Präsequenz	Diplomarbeit
pRenEGFP ProIII	wie prenEGFP OB5; Deletion der Prosequenz	Diplomarbeit
pRen2EGFP	Präprorenin (Klar) carboxyterminal in frame mit EGFP in pEGFP-N1 kloniert	Diese Arbeit
pSP73/ actin	PSP73 Vektor mit 273bp-Fragment des murinen Aktin Gens; Sonde für Protection Assay	Wagner et al. 1997
pSP73/ renin	PSP73 Vektor mit 194bp-Fragment des murinen Renin1 ^c Gens; Sonde für Protection Assay	Wagner et al. 1997

1.3 Antikörper

Name	Beschreibung	Hersteller
Anti- GFP	Polyklonales Serum (rabbit)	Molecular Probes
Anti- Renin	Polyklonales Serum Ig G (chicken)	Davids
Anti- Chicken	Polyklonales Serum Ig G Biotin-Konjugat (donkey)	ICN

1.4 Medien, Puffer und Lösungen

LB-/LB_{amp}⁻/LB_{kan}⁻ Medium

10g NaCl; 10g Bacto-Trypton ; 5g Yeastextract
für LB_{amp}-Medium zusätzlich 100µg/ml Ampicillin
für LB_{kan}- Medium zusätzlich 25µg/ml Kanamycin

SOC- Medium

20g Bacto-Trypton; 5g Yeastextract, 0,5g NaCl; 2,5ml 1M KCl; 10ml 1M MgCl; 20ml
1M Glucose ; add 1l H₂O

LB-/LB_{amp}⁻/LB_{kan}⁻ Agarplatten

10g NaCl; 10g Bacto-Trypton ;5g Yeastextract; 20g Agar
für LB_{amp}-Platten zusätzlich 100µg/ml Ampicillin
für LB_{kan}- Platten zusätzlich 25µg/ml Kanamycin

JG- Zellen Zellkulturmedium

500ml RPMI 1640 Medium (aus Trockenmedium hergestellt; 1g NaHCO₃ zugesetzt)
5ml Pen/ Strep Lösung (1000 U Penicillin, 10mg/ml Streptomycin);10ml fetales
Kälberserum;

Medium für die Isolation von JG-Zellen

500ml RPMI 1640 Medium
5ml Pen/ Strep Lösung (1000 U Penicillin, 10mg/ml Streptomycin);10ml fetales
Kälberserum;

As4.1-Zellkulturmedium

500ml Dulbecco´s modified Eagle Medium
5ml Pen/ Strep Lösung (1000 U Penicillin, 10mg/ml Streptomycin);25ml fetales
Kälberserum; 5ml 100mM Na-Pyruvat

As4.1-Zellen Transfektionsmedium

500ml Dulbecco's modified Eagle Medium (DMEM)

Zusammensetzung wie As4.1 Zellkulturmedium ohne die Zugabe von fetalem Kälberserum.

10xTBE

108g Tris; 55g Borsäure; 40ml 0,5M Na₂EDTA (pH8.0); add 1l H₂O

10xPBS

80g NaCl; 2g KCl; 26,8g Na₂HPO₄·7H₂O; 2,4g KH₂PO₄ ; gelöst in 1l H₂O, pH7,4

10xTBS

81,8g NaCl; 24,23g Tris; 18,6g Na₂EDTA; add 1l mit Bidet H₂O; pH 7,5 einstellen mit HCl

Lysepuffer

2,5g Natriumdodecylsulfat (SDS); 0,3g Tris; in 250ml Bidest lösen; pH 7,4 einstellen;
1Tablette Complete Mini Protease Inhibitor Mix (Roche) pro 10ml Lysepuffer

5x SDS- Probenpuffer

195mM Tris/HCl pH 7,5; 6%SDS; 15% Mercapthoethanol; 12%Sachcharose; 0,5% Bromphenolblau; add 50ml mit Bidest H₂O

Sammelgelpuffer

3,36g Tris; 0,22g SDS; add 200ml mit Bidest H₂O; pH 6,8 mit HCl

3x Trenngelpuffer

68,2g Tris; 1,5g SDS; add 500ml mit Bidest H₂O; pH 8,8 mit HCl

Transfer- Puffer

2,4g Tris ; 11,25g Glycin; 1ml 20% SDS; 200ml Methanol ; add 1l H₂O

Blockierungslösung für Western Blot Membranen

TBST mit 5% Milchpulver

1xTBST

1ml Tween 20 add 1l 1xTBS

DEPC-H₂O

1ml DEPC zu 1l H₂O zugeben, kräftig schütteln und ü.N. stehen lassen;

Am nächsten Tag autoklavieren

TNES Puffer

10mM Tris pH 7,5; 400mM NaCl; 100mM EDTA; 0.60% SDS

Lösung D

250g Guanidinium Thiocyanat ; 293ml H₂O ; 125 ml 0,1M Na-Citrat; 26,4ml 10%

Sarcosyl; Vor Gebrauch: 50ml Lösung D; 260µl 2-Mercaptoethanol

Wassergesättigtes Phenol

1kg Phenol bei ca. 60⁰C schmelzen; add 1,5l DEPC-H₂O; aufgießen, schütteln,

Phasen trennen lassen

2M Natriumacetat pH 4

41,02g Natriumacetat; 120ml Eisessig ; add 250ml DEPC-H₂O

Hybridisierungspuffer

40mM PIPES; 400mM NaCl; 80% Formamid; 5mM Na-EDTA; add 40ml DEPC-H₂O

RNase-Puffer

10mM Tris/HCl (pH 7.5); 5mM EDTA; 300mM NaCl

RNase Stammlösung

4mg/ml RNase A; 200µg/ml RNase T1; in 4ml RNase Puffer

Proteinase K Stammlösung

1mg/ml Proteinase K in RNase-Puffer lösen und vor Gebrauch 200µl einer 20% SDS Lösung zugeben

8% Acrylamidgel

Rotiphorese Sequenziergelsystem; 320ml Konzentrat; 580ml Verdünner; 100ml Puffer

Maleatpuffer

12,2g Tris; 17,4g Maleinsäure; 8,9g EDTA; add 1l H₂O; pH 6

Analysepuffer (Gewebe-RIA)

0,3M Sucrose; ; 10mM Tris pH 7,4; 1mM EDTA

PBS- Otto

Lsg.A: 4,56g K₂HPO₄ x 6H₂O; 16,36g NaCl; add 1,5l H₂O

Lsg.B: 0,68g KH₂PO₄; add 0,5l H₂O

Einstellen der Lsg.A auf einen pH von 7,5 mittels Lsg.B; mit H₂O Auf ein Endvolumen von 2l

HRP- Waschpuffer

4g NaCl; 6g Tris; 200µl 4% Triton-X 100 add 0,5l mit Bidest H₂O; pH 7,4 einstellen mit HCl

HRP-Blockierlösung

10ml Tris/HCl 0,2 M; 5ml inaktiviertes Pferdeserum; 5ml Bidest H₂O; 5ml 4% Triton-X 100; 200mg NaCl

Phenylhydrazin/Waschpuffer

1mg Phenylhydrazin in 50ml HRP- Waschpuffer lösen.

H₂O₂/Phenylhydrazin/Waschpuffer

2,5µl einer 6% H₂O₂ Lösung auf 25ml Phenylhydrazin/Waschpuffer

DAB- Lösung

0,1M Tris; 168 μ M NiCl₂ x 6 H₂O; 8,4 μ M CoCl₂ x 6 H₂

1.5 Chemikalien, Enzyme und kommerzielle Kits

Produkt	Hersteller
ABC Detektionskomplex, Vectastain	Vektor
Acrylamid/Bisacrylamid Lösung	Roth
Agarose	Sigma
Ammoniumpersulfat	BioRad
Angiotensin I Radioimmunoassay RENCTK	DiaSorin
Bacto Agar, Bacto Pepton	Difco
Biomax MR- Filme	Kodak
Borsäure	Merck
Bromphenolblau	Merck
Chloroform	Merck
Collagenase 1	Roche
Diethylenpyrocarbonat (DEPC)	Fulka
Dinatriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Merck
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma
DNA Purification System	Promega
dNTPs	Promega
[γ ³² P] UTP 250 μ Ci, [γ ³³ P] GTP 250 μ Ci, [α ³³ P] ATP 250 μ Ci, DNase (20000 U/ml)	Amersham
DNA Standard	Merck
DMEM Medium	Biochrom
ECL Entwicklerlösung	Pierce, Rockford
EGTA	
Essigsäure 100%	Merck
Ethanol p.A	Merck

Ethidiumbromid	Sigma
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Merck
Fetales Kälberserum (FCS)	Biochrom
First Strand Buffer	Invitrogen
Forskolin	Sigma
Furosemid	Hexal
Glycerin 87%	Roth
Guanidiumthiocyanat	Fluka
HCl 1N	Merck
Hefeextrakt	Difco
Isoproterenol	Sigma
3-Isobutyl-1-Methyl-Xanthin (IBMX)	Sigma
Kaleidoscope Protein Standard	BioRad
Kaliumchlorid (KCl)	Merck
Kalziumchlorid (CaCl_2)	Merck
Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4)	Merck
Kobaltchlorid	Merck
Laufpuffer (Western Blot)	BioRad
Maleinsäure	Merck
2-β- Mercaptoethanol	Merck
Methanol p.A	Merck
M-MLV Reverse Transkriptase	Invitrogen
Nagetierfutter, 0,02% 0,6% 8% NaCl	ssniff Spezialdiäten
Natriumacetat	Merck
Natriumchlorid (NaCl)	Merck
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Serva
Natronlauge (NaOH)	Merck
Nickelchlorid	Merck
Nitrocellulose Blotting Membranen	BioRad
Oligo(dT) ₁₂₋₁₈ Primer	Invitrogen
Olomoucine	Calbiochem
Penicillin / Streptomycin	Biochrom

Percoll	Amersham Bioscience
Pferdeserum	Sigma
Phenol	Merck
Phenylhydrazin Hydrochlorid	Sigma
Ponceau S	Sigma
Restriktions- und DNA modifizierende Enzyme	Boehringer
Restriktionsenzyme mit Restriktionspuffer	MBI- Fermentas
Rinderserumalbumin (BSA)	Sigma
RNase A	Boehringer
Roscovitin	Calbiochem
Röntgen Rapid Entwickler und Fixierer	Adefo
RPMI 1640-Medium	Biochrom
Saccharose	Sigma
Sarcosyl	Fulka
T4-DNA Ligase	Pharmacia
TEMED	BioRad
TOPO-pCRII Cloning Kit; TOPO-pCR2.1 Cloning Kit	Invitrogen
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan	Merck
Triton X-100	Serva
Trypsin	Sigma
Tween 20	Sigma
Wasserstoffperoxid (H_2O_2)	Merck
Whatman- Papier	Schleicher und Schuell
Wizard PCR Preps	Promega
Quanti Tect SYBR Green real Time PCR Kit	Quiagen
QIAGEN Plasmid Maxi Kits	Quiagen
Quinacrine	Sigma

1.6 Verbrauchsmaterial und Geräte

Verbrauchsmaterial:

Produkt	Hersteller
Auslaufpipetten 5 ml, 10 ml, 25 ml	Sarstedt
Chamberslides 8- well	Nalge Nunc International (Lab-Tek® II)
Deckgläschen	Labonord
Glaswaren	Schott, Roth
Handschuhe	Hartmann, Roth
Lightcycler- Kapillaren	Roche
Multiwellplatten 96-, 24-, 6-Well	Wellplatten 96, 24, 6
Objektträger Superfrost Plus	Labor Schubert
Pipettenspitzen mit/ ohne Filter	Biozym, Sarstedt
Reagiergefäße 0,5 ml, 1,5 ml, 2,0 ml	Sarstedt
Schraubgefäße 15 ml, 50 ml	Sarstedt
Skalpellklingen	Feather
Sterilfilter	Renner
Zellkulturflaschen 25cm ² , 75cm ² , 125cm ²	Sarstedt

Geräte:

Geräte	Hersteller
Analysenwaage	Mettler, H-20T
Autoklav	KSG 112
Elektrophoreseapparatur	Life Technologies Inc., Mod S2 Pharmacia, LKB 2050 MIDGET
Gamma Counter	1282 Compugamma CS, LKB Wallac
Geltrockner	BIO-RAD, Model 583 gel-dryer Vacuum Slab gel-dryer
Heißluftschüttler	New Brunswick Scientific, Innova 4000
Inkubationsschrank	Heraeus, Modell B6200 IG 150 Jouan
Instant Imager	Packard, Electronic Autoradiographie
Kühl- und Gefrierschränke	AEG, Santo Kühlschrank Siemens, Comfort plus Gefrierschrank New Brunswick Scientific, Ultra-low-freezer-85°C
Magnetrührer	Heidolph, MR 3001
Mikroskop	Zeiss, IG 03 Zeiss, Axioskop2 plus; AxioCam Zeiss, LSM 501
Ölpumpe	Edwards, High Vacuum Pump Typ B5/2208
PCR Geräte	MWG, Mod. Omnigene Thermocycler Perkin Elmer, DNA Thermo Cycler 480 Roche, Lightcycler
pH-Meter	Knick, Digital pH-Meter
Pipetten	Gilson, Pipetman P10, P20, P100, P200, P1000
Spannungsquellen	Pharmacia, LKB ECPS 3000/150 Pharmacia, LKB GPS 200/400 Pharmacia, Multidirve XL

Sterilbank	Jouan, IC 2.12
Szintillationszähler	Packard, Tri- Carb 1500
UV-Spektrometer	Pharmacia, Gene Quant II
UV- Leuchttisch	Renner, Fluorescent Tables
Vortexgeräte	Schientific Industries, Vortex Genie 2
Vakuumzentrifuge	
Waage	Mettler, P-1210 Feinwaage
Wärmeblock	Eppendorf, Thermostat 5320 Eppendorf, Thermomixer 5436
Zentrifugen	Heraeus Varifuge 20RS Heraeus Megafuge1.0 Eppendorf Centrifuge 5417R

1.7 Internetdienste und Software

The National Center for Biotechnology Information: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

Webcutter II: <http://www.firstmarket.com/firstmarket/cutter/cut2.html>

Nebcutter V2.0: <http://tools.neb.com/NEBcutter2/index.php>

ExPASy Proteomics Server: <http://www.expasy.ch/sprot/>

2 Methoden

2.1 Tierhaltung und Kultivierung eukaryontischer Zellkulturen bzw. Organismen

2.1.1 Tierhaltung

Alle Tiere hatten freien Zugang zu Futter und Wasser und wurden bei gleich bleibender Raumtemperatur bzw. Luftfeuchtigkeit und 12- stündigen Hell-Dunkel-Intervallen gehalten. Vor Erreichen der Geschlechtsreife wurden die Tiere separiert. Anstehende Plasmarenin- und iPN Versuchen wurden erst nach einem mehrtägigen „an die Hand“ gewöhnen der Tiere durchgeführt um eine Erhöhung der Plasmarenin Werte durch Stress weitgehend ausschließen zu können.

Während der Versuche für die chronische Stimulation des RAAS hatten die Tiere entsprechend nur Zugang zu Niedrigsalz-Futter und zu Ramipril versetzten Trinkwasser.

2.1.2 Anzucht und Kultivierung der As4.1 Zellen

Die mit dem SV40 Antigen immortalisierte murine juxtaglomeruläre Zelllinie As4.1 wurde von der amerikanischen Type Culture Collection (ATCC No. CRL 2193) bezogen (Sigmund et al., 1990). Die Kultivierung der adhärenenten Zellen erfolgte in 75cm² großen Zellkulturflaschen. Als Kulturmedium wurde Dulbecco's modified Eagle Medium (DMEM) unter Zugabe von 5% FCS, 2,5 ml 200 mM L-Glutamin, 2.5 ml 100 mM Na- Pyruvat, 100 U/ml Penicillin und 100µg/ml Streptomycin verwendet. Die Kultivierung erfolgte im Zellkulturschrank bei 37⁰C und 10% CO₂. Bei 90% Konfluenz wurden die Zellen mit 1,5ml einer 0,25% Trypsin / 0,02% EDTA Lösung abgelöst, 1:5 gesplittet und in neue Kulturflaschen ausgesät.

Das Anlegen von Dauerkulturen erfolgte durch Ablösen der Zellen mittels Trypsin, Waschen der Zellpellets mit Zellkulturmedium und anschließendem Lösen der Zellen in steril filtrierten 8 % DMSO Kulturmedium. Diese wurden dann langsam (1⁰C/min) in einer Cryobox auf –80⁰C abgekühlt und die Aufbewahrung erfolgte in flüssigen Stickstoff.

2.1.3 Kultivierung der *E.coli* Bakterien

Die Kultivierung der *E.coli* Bakterien erfolgte bei 37°C in LB-Medium über Nacht (ÜN) unter Schütteln bei 250rpm. Plasmid tragenden *E.coli* Stämmen wurde zusätzlich- je nach Plasmid tragender Resistenz- 25µg/ml Kanamycin oder 100µg/ml Ampicillin zugesetzt. Um Dauerkulturen anzulegen wurden 400µl einer *E.coli* Bakterien Suspension mit 15% Glycerin versetzt und sofort in flüssigen Stickstoff schockgefroren. Die anschließende Aufbewahrung erfolgte bei -80°C.

2.2 **Gentechnische Methoden**

2.2.1 Transformation von *E.coli*

Für die Transformation von Bakterien mit Plasmid- DNA wurden chemisch kompetente *E.coli* JM109 der Firma Promega verwendet. 50µl Zellaliquots wurden mit 50ng Plasmid- DNA für 20min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock bei 42°C für 1min wurde nochmals 2min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen nach Zugabe von 250µl SOC- Medium 45min bei 37°C und 200rpm geschüttelt. Die Bakteriensuspension wurde auf Selektionsplatten (25µg/ml Kanamycin) ausplattiert und ü.N. bei 37°C inkubiert.

2.2.2 Transfektion von As4.1 Zellen

70 000 Zellen/well wurden 18h vor der Transfektion in 24er Well Platten ausgesät. In je 94µl serumfreies Transfektionsmedium wurden 6µl Transfektionsreagenz FuGENE 6 pipettiert und 5min bei RT inkubiert. Nach Zugabe von je 10µl [0,1µg/µl] der zu transfizierenden Plasmid- DNA wurde für weitere 15min bei RT inkubiert und anschließend 500µl Zellkulturmedium zugegeben. Das Transfektionsverhältnis von Plasmid- DNA und Transfektionsreagenz wurde im Zuge dieser Arbeit mit einem Verhältnis von 2:4 ermittelt Die Transfektionsansätze wurden vollständig nach Absaugen des alten Kulturmediums auf die Zellen pipettiert. Nach 18h wurde das Kulturmedium gewechselt. Für größere Transfektionsansätze wurde das Protokoll entsprechend der „Wellgröße“ im Bezug auf Zellzahl und Volumen des Transfektionsansatzes verändert.

Für die konfokale Mikroskopie wurden besondere Zellkulturkammern verwendet. Hier wurden 10000 Zellen ausgesät und mit einem entsprechend reduzierten Transfektionsansatz transfiziert

2.3 Isolierung und Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

2.3.1 Isolierung genomischer DNA aus Mäuseschwänzen

Den Tieren wurde ein ca. 0,5 cm langes Stück der Schwanzspitze mit einem sterilen Skalpell abgetrennt. Es wurde in einem 1,5ml Eppendorf Cup mit 600µl TNES Puffer und 10µl Proteinase K (10mg/ml) versetzt und anschließend bei 55°C unter leichtem Schütteln ü.N. inkubiert. Nach Zugabe von 166,7µl einer 6M NaCl Lösung wurde für weitere 15min unter starkem Schütteln inkubiert. Die Proben wurden bei 13000rpm und RT für 15 min zentrifugiert und der klare Überstand in ein steriles Cup überführt. Es erfolgte die Zugabe von 500µl 100%EtOH, der mit der Probe durch drehen des Cups vermischt wurde. Die Proben wurden bei 13000rpm, RT zentrifugiert, anschließend mit 80% EtOH gewaschen. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt für 10min wurde der Überstand vorsichtig entfernt und das Pellet für ca. 10-15min an der Luft getrocknet. Die genomische DNA wurde in sterilem Wasser für 1h bei 55°C gelöst und für die Vermessung der Konzentration 1:100 verdünnt.

2.3.2 Isolierung Plasmid- DNA aus *E.coli*

Die Plasmidpräparation aus 100ml LB- Kulturen (Maxipräp) erfolgte mit Hilfe des QIAGEN Plasmid Maxi Kits laut beiliegendem Standardprotokoll. Die Plasmid- DNA wurde nach der Aufreinigung in 500µl destilliertem Wasser aufgenommen. Die Gewinnung von Plasmid- DNA aus 2ml LB- Kulturen (Minipräp) wurde unter Verwendung der Puffer des QIAGEN Plasmid Maxi Kits nach folgendem Protokoll durchgeführt. 2ml der *E.coli* Suspension wurden bei 14000rpm in einer Eppendorf Tischzentrifuge 2min zentrifugiert und nach Verwerfen des Überstandes das Bakterienpellet in 300µl P1 resuspendiert. Nach Zugabe von 300µl P2 und 5min Inkubation bei RT wurden 300µl P3

zugegeben und weitere 10min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde 15min bei 14000rpm zentrifugiert und der Überstand in einem neuen Eppendorfreaktionsgefäß mit 675µl 100% Isopropanol bei 14000rpm 15min gefällt. Das Pellet wurde mit 250µl 70% Ethanol gewaschen und 15 min zentrifugiert. Der Ethanol wurde abgesaugt und das Pellet bei 37°C getrocknet. Die Plasmid- DNA wurde in 40µl zweifach destilliertem Wasser aufgenommen.

2.3.3 Isolierung der Gesamtribonukleinsäure aus Zellen

Die Isolation der RNA aus eukaryontischen Zellen erfolgte leicht abgewandelt nach dem Guanidinium-Phenol-Chloroform Protokoll von Chomczynski und Sacchi (1987). Für die RNA-Isolation wurden grundsätzlich nur RNase- freie Plastik- und Glaswaren verwendet. Zweifach destilliertes H₂O wurde vor der Verwendung mit DEPC behandelt. Die Zellen wurden in 25cm² Flaschen kultiviert. Zur RNA- Isolation wurde das Medium vollständig abgesaugt und die Zelllyse durch Zugabe von 500µL Lösung D⁺ die Zelllyse durchgeführt. Das Zelllysate wurde mit Hilfe eines Zellschabers vom Flaschenboden abgelöst und in ein Eppendorfreaktionsgefäß überführt. Anschließend wurden 50µl Na-Acetat pH5.2 3M, 500µl Phenol pH4 und 100µl Chloroform zugegeben und der gesamte Ansatz kräftig für mindestens 20sec gevortext. Nach einer 15min Inkubation auf Eis und einer Zentrifugation bei 10000g für 15min bei 4°C in einer Eppendorftischzentrifuge erfolgte eine Phasentrennung. Die obere wässrige Phase (ca. 500µl) wurde abgenommen und in neues Eppendorfreaktionsgefäß überführt, mit 500µl 100% Isopropanol p.A. gemischt. Die RNA wurde durch Inkubation für mindestens 1h bei -20°C und anschließender Zentrifugation bei 15000g für 30min bei 4°C in einer Eppendorftischzentrifuge gefällt. Der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet in 250µl 70% Ethanol gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation und Abnahme des Überstands wurde das Pellet für 30min bei RT getrocknet und danach in 100µl H₂O gelöst. Die RNA- Isolierung aus 24 wells erfolgte nach gleichem Protokoll. Zusätzlich wurde, nach dem Aufnehmen der Zellen in Lösung D⁺, 10µg t-RNA zugegeben.

2.3.4 Isolierung der Gesamtribonukleinsäure aus Gewebe

Für die RNA-Isolation wurden grundsätzlich nur RNase- freie Plastik- und Glaswaren verwendet. Zweifach destilliertes H₂O wurde vor der Verwendung mit DEPC behandelt. Alle Arbeitsschritte wurden auf Eis durchgeführt. Eine Mäuseniere wurde in 3ml Lösung D⁺ aufgenommen und mit dem ...homogenisiert. Danach erfolgte die Zugabe von 300µl Na-Acetat pH4.8, 2M; 3ml sauer.Phenol und anschließend 600µl Chloroform. Dazwischen wurde jeweils gevortext. Nach einer 15min Inkubation auf Eis und einer Zentrifugation bei 10000g für 20min bei 4°C erfolgte die Phasentrennung. Die obere wässrige Phase wurde abgenommen und in ein neues Gefäß überführt und mit 3ml 100% Isopropanol p.A. gemischt. Die RNA wurde durch Inkubation für mindestens 1h bei -20°C gefällt. Nach einer Zentrifugation bei 10000g für 20min und bei 4°C wurde der Überstand vorsichtig abgesaugt und das Pellet in 400µl Lösung D⁺ resuspendiert. Anschließend wurden 40µl Na-Acetat pH4.8 2M, 400µl Phenol pH4 und 1000µl EtOH 100% zugegeben und der gesamte Ansatz gevortext. Nach einer Zentrifugation bei 10000g für 20min und bei 4°C wurde der Überstand vorsichtig abgesaugt und das Pellet in 250µl 70% Ethanol gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation und Abnahme des Überstands wurde das Pellet in der SpeedVac getrocknet und danach in 400µl H₂O bei 65°C unter leichtem Schütteln resuspendiert.

2.3.5 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration erfolgte im Photometer bei 260nm. Plasmid- DNA (1:20), RNA (1:50) und genomische DNA (1:100) wurden dabei entsprechend in DEPC- Wasser verdünnt. Die Reinheit der Nukleinsäuren wurde über den Quotienten Protein- (280nm) und Plasmid-DNA- (260nm)/ RNA- Konzentration (260nm) /genomische DNA (260nm) bestimmt.

2.4 **RNAse- Protection Assay**

Zur Quantifizierung der Expression von Renin und Aktin wurde ein RNAse-Protection Assay durchgeführt. Für das zu untersuchende Gen wurde eine Sonde erstellt, indem

ein PCR-Fragment mit BamHI / EcoRI Adaptoren generiert und in die Polylinker-Site des pSP73-Vektors kloniert wurde, so dass durch eine in vitro Transkription mit einer SP6-Polymerase eine antisense cRNA entsteht. Für das Aktin Gen wurde mittels der Primer SupAct1 und SupAct2 eine 273bp und für das Renin Gen mittels der Primer KLAR58 und KLAR59 eine 194bp lange Sonde erstellt. Nach der Linearisierung des Vektors durch HindIII und anschließender Überprüfung, erfolgte in einer in vitro Transkription die Bildung von radioaktiv [α - 33 P] GTP markierter cRNA. Die Hybridisierung erfolgte in 50 μ l Hybridisierungslösung mit 10 μ g Gesamt-RNA für das Renin-Gen und mit 2 μ g Gesamt-RNA für das Aktin-Gen pro Ansatz bei 60°C ü.N., wobei in 50 μ l Hybridisierungslösung 500000cpm der jeweiligen radioaktiv markierten Sonde zugesetzt wurde. Durch den anschließenden Zusatz von RNase A/T1 für 30min bei RT wurde die nicht hybridisierte RNA und Sonde geschnitten, der nachfolgende Proteinase K Zusatz (1mg/ml) mit Inkubation für 30min bei 37°C inaktivierte die RNase A/T1. Eine anschließende Reinigung der RNA-Hybride erfolgte durch Phenol- Chloroform- Isoamylalkohol Gemisches und anschließender Fällung der RNA-Hybride aus dem wässrigen Überstand durch Isopropanol und zusätzlich 20 μ g tRNA. Der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet nach vollständiger Trocknung an Luft in 5 μ l Ladepuffer aufgenommen. Vor dem Auftragen auf ein 8% Polyacrylamidgel wurden die Hybride bei 94°C für 15min aufgeschmolzen. Der Gellauf erfolgte für 2.5h bei 80W. Nachdem Lauf wurde das Gel im VaKuumtrockner getrocknet und im Phosphoimager ausgewertet.

2.5 PCR Reaktionen

2.5.1 Reverse Transkription

Für die Reverse Transkriptasereaktion wurden 2 μ g total RNA in 9 μ l DEPC- Wasser mit 1 μ l [0,5 μ g/ μ l] Oligo d(T₁₂₋₁₈) Nukleotiden gemischt, für 5min auf 65°C erhitzt und anschließend sofort auf Eis gestellt. Nach Zugabe eines Prämixes bestehend aus 4 μ l first strand buffer, 0,5 μ l RNAsin, 4 μ l dNTPs (2,5mM), 2,5 μ l DEPC- Wasser und 1 μ l Reverser Transkriptase wurde der 22 μ l Ansatz für 1h bei 37°C inkubiert und anschließend für 2min auf 94°C erhitzt. In die PCR wurden jeweils 2 μ l der reversen Transkription eingesetzt.

2.5.2 Polymerasekettenreaktion

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) wurde standardmäßig und falls nichts anderes angegeben in einem 20µl Ansatz mit 1µl Taq (Roche), 2µl 10x PCR-Puffer, 2µl dNTPs (je 2.5mM), 2µl cDNA und je 1µl des sense und antisense Primers (je 10pmol) durchgeführt. Die Ansätze wurden mit Mineralöl überschichtet. Das Protokoll bestand aus 32 Zyklen mit 30sec Denaturierungsphase bei 94°C, 30sec Annealingphase bei 60°C und 1min Elongationsphase bei 72°C. Nach Ablauf des Amplifikationsprotokolls wurde der PCR- Ansatz für weitere 10min bei 72°C inkubiert. Bei der Amplifikation des Reningens wurde das Protokoll in zwei Schritten abgewandelt: 35 Zyklen und 2min Elongationsphase.

Für die Genotypisierung wurden 100ng genomische DNA eingesetzt und nach einer einmaligen vor geschalteten 5 min Denaturierungsphase bei 95°C das Protokoll wie folgt abgewandelt:

34 Zyklen; Denaturierung bei 95°C für 1min; Annealingphase bei 55°C für 1 min

2.5.3 Quantitative Polymerasekettenreaktion

Die quantitative Polymerasekettenreaktion wurde mit dem QuantiTect™ SYBR® Green PCR Kit von QIAGEN durchgeführt. Alle Proben wurden in einem Reaktionsvolumen von 20µl mit 10µl des QuantiTect™ SYBR® Green PCR Mastermix, je 1pmol sowohl des sense als auch des antisense Primers, 6µl zweifach destilliertem Wasser und 2µl cDNA vermessen. Das Amplifikationsprotokoll bestand, nach der 15 min Aktivierung der HotStarTaq™ DNA-Polymerase bei 95°C, aus 40 Zyklen mit einer 15sec Denaturierungsphase bei 95°C, 20sec Annealingsphase bei 56°C und einer Elongationsphase bei 72°C für 20sec. Die Fluoreszenzmessung erfolgte nach jedem Zyklus am Ende der Elongationsphase. Nach dem Durchlaufen des Amplifikationsprogramms wurde das Schmelzverhalten der amplifizierten DNA analysiert. Dazu wurde die DNA langsam (0,10C/ sec) von 60°C auf 95°C erhitzt und die Fluoreszenz kontinuierlich gemessen.

2.6 **Plasmidgenerierung**

2.6.1 Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA- Fragmenten

DNA- Fragmente wurden nach Sambrook et al. (2001) durch horizontale Gelelektrophorese aufgetrennt. Fragmente bis zu 300bp mit Hilfe von 2% TBE Agarosegelen, Fragmente > 300bp mit 1% Gelen bei 120V.

2.6.2 Aufreinigung von DNA

Die Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgte durch gelelektrophoretische Auftrennung bei 100V in high-melting Agarosegelen. Die entsprechenden Banden wurden ausgeschnitten und Vorschrift des Wizard PCR Preps DNA Purification Systems der Firma Promega behandelt.

2.6.3 Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen

Die Restriktionen wurden in 20µl oder in 50µl Ansätzen durchgeführt. Es wurde dabei nach der Methodensammlung von Sambrook et al. Verfahren. Die Puffer und Enzyme wurden laut Vorschriften der Enzymhersteller eingesetzt.

2.6.4 Ligation von DNA-Fragmenten

Die Ligation erfolgte nach Vorschrift von Sambrook et al. (2001). Ligierte wurde in 20µl Ansätzen bei 14°C üN oder 1h bei RT.

2.6.5 DNA-Sequenzanalyse

Alle Sequenzierungen von Plasmid- DNA wurden von der Firma SequiServe in Vaterstetten durchgeführt.

2.7 **Proteinbiochemische Methoden**

2.7.1 Proteinextrakt aus As4.1 Zellen

Bei 90% Konfluenz der Zellen in einer 75 cm² Kulturf flasche wurden das Medium abgenommen und die Zellen zweimal mit 1x PBS gewaschen. Das PBS wurde vollständig abgenommen und anschließend die Zellen mittels eines Zellschabers vom Kulturschalenboden gelöst. Die Zellsuspension wurde in 500µl kaltem Lysepuffer mit Proteaseinhibitorcocktail (Roche) aufgenommen, mit 100µl 6x SDS-Loading Buffer versetzt und sofort für zweimal 10 sec. mit Ultraschall aufgeschlossen. Nach 5 min Inkubation bei 94⁰C wurde der Proteinextrakt zentrifugiert und entweder sofort auf ein SDS- Gel geladen oder in flüssigen Stickstoff weg gefroren. Für die Analyse des Überstands wurde 0,1%FCS Medium ohne Phenolrot verwendet. Der Überstand wurde nach 18-24h gesammelt und einrotiert.

2.7.2 Proteinbestimmung

Proteinbestimmung wurden mit einer modifizierten Methode nach Lowry et al. (1951) durchgeführt. Die Probe wurde auf 100µl Volumen gebracht und nach Zugabe von 5ml Biorad Lowry-Lösung 5 – 60 min bei RT inkubiert. Zur Eichung des Tests wurden die Messungen mit BSA- Mengen von 1- 15µg durchgeführt. Die Proteinkonzentration wurde photometrisch bei 595nm bestimmt.

2.7.3 Auftrennung von Proteinen

Die Auftrennung von Proteinen erfolgte über 10% SDS-Polyacrylamidgele, wobei die aufzutrennende Probe je nach Volumen mit 6x SDS-Probenpuffer versetzt wurde. Die Elektrophorese erfolgte bei 150V bis zum Auslaufen der blauen Farbstoffbande.

2.7.4 Western Blot Analyse

Zum Immunnachweis wurden Proteine nach der Auftrennung über SDS-PAGE elektrophoretisch 1,5h bei 150mA auf eine Nitrozellulosemembran überführt und anschließend reversibel mit Ponceau S gefärbt. Zur Absättigung der Membran wurde diese mindestens 30min in Blockierungspuffer inkubiert. Anschließend wurde im gleichen Puffer der primäre Antikörper entsprechend verdünnt zugeben und entweder für 2h bei RT oder bei 4°C ü.N. inkubiert. Die Membran wurde danach dreimal für je 10min in 10ml PBS-Lösung gewaschen und anschließend mit den sekundären an Peroxidase gekoppelten Antikörper in entsprechender Verdünnung inkubiert. Die Detektion des gebundenen Peroxidasekonjugats erfolgte mit Hilfe des ECL Western Blot Detections Kits (Pierce) laut Herstellerangaben

2.8 **Bestimmung des Reningehalts**

2.8.1 Zellkultur

Um die Reningenexpression in As4.1 Zellen zu bestimmen wurde in einer enzymatischen Reaktion die durch Renin katalysierte Bildung von Angiotensin I aus Angiotensinogen gemessen, wobei das gebildete Angiotensin I direkt proportional zum in der Probe enthaltenen Reningehalt ist. Die Bestimmung der Angiotensin I Konzentration wurde mit einem Radioimmunoassay der Firma Sorin Biomedica durchgeführt.

80000 As4.1 Zellen wurden pro Well in einer 24er Wellplatte ausgesät und 16 bis 24h später das Medium gegen Medium mit Zusatz der Testsubstanzen ersetzt. Die Inkubation der Zellen erfolgte für 18h. Danach wurde der Überstand von den Zellen abgenommen und die Zellen in 1xPBS mit 0,1% Triton x-100 unter leichtem Schütteln bei RT für 20min lysiert. Das Zelllysate und der Zellüberstand wurden für 5min bei 10000g in einer Eppendorf Tischzentrifuge zentrifugiert. Anschließend

wurde aus den jeweiligen Überständen je 8µl Probe entnommen und mit 5µl Puffer (Sorin Biomedica), 1µl PMSF, 4µl Rattenserum (aus bilateral nephrektomierten Ratten) und 7µl Maleatpuffer versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde für 90min bei 37°C inkubiert und anschließend auf Eis gestellt. 22µl der Probe wurde in ein mit einem Antikörper gegen Angiotensin I beschichtetes Röhrchen überführt und mit 500µl Tracer (enthält ¹²⁵J markiertes Angiotensin I in einer definierten Konzentration) für weitere 3 bis 24h bei RT inkubiert. Der wässrige Überstand wurde nach Ablauf der Inkubationszeit abgenommen und die im Röhrchen verbliebene Radioaktivität im γ-Zähler bestimmt. Aus der Radioaktivität konnte anhand definierter Standardproben auf das gebildete Angiotensin I rück geschlossen und somit auch der aktive Reningehalt im Zelllysate und im Zellüberstand bestimmt werden.

Das Aufbereiten der Zellen nach Olomoucine Behandlung erfolgte ebenfalls nach oben beschriebenem Schema.

2.8.2 Gewebe

Die nach der Präparation bei -80°C eingefrorenen Organe wurden geteilt und in 3ml Analysepufer inkl. Proteaseinhibitoren mittels Ultra- Turax Mixer zerkleinert und anschließend für die Analyse 1:100 mit Maleatpuffer verdünnt. Davon wurden 50µl entnommen und mit 50µl des Puffer- Reninsubstratgemisches (Verhältnis 5:4) und 2µl PMSF versetzt. Jeweils 51µl wurden bei 4°C (entspricht dem sog. Kaltwert) bzw. bei 37°C (entspricht dem sog. Warmwert) für 90min inkubiert und anschließend auf Eis gestellt. 45µl des jeweiligen Reaktionsansatzes wurden für die Quantifizierung in den Radioimmunoassay-Kit, wie oben beschrieben in den entsprechenden Verhältnissen eingesetzt.

2.8.3 Plasma

Den Mäusen wurde durch Schwanzbiopsie bzw. durch Dekapitieren Blut entnommen, das in 75µl Hämatokritröhrchen mit je 1µl 125 mM EDTA aufgenommen wurde. Durch Zentrifugation in einer Hämatokrit- Zentrifuge für 5min bei 12500g wurde das Plasma von den festen Blutbestandteilen abgetrennt und anschließend in ein Eppendorfcup überführt. Die Lagerung des Plasmas erfolgte bei -20°C. Für die Quantifizierung des Renins wurde das Plasma 1:20 mit Maleatpuffer verdünnt und

davon wiederum 50µl mit 50µl des Puffer- Reninsubstratgemisches (Verhältnis 5:4) und 2µl PMSF versetzt. Jeweils 51µl wurden bei 4°C (entspricht dem sog. Kaltwert) bzw. bei 37°C (entspricht dem sog. Warmwert) für 90min inkubiert und anschließend auf Eis gestellt. 45µl des jeweiligen Reaktionsansatzes wurden für die Quantifizierung in den Radioimmunoassay-Kit- wie oben- beschrieben eingesetzt.

2.9 Isoliert perfundierte Niere

Messungen an der isoliert perfundierten Niere wurden nach dem Protokoll von Schweda und Kollegen (Schweda et al., 2003) durchgeführt.

Die Tiere wurden mittels intraperitonealer Injektion von 5-ethyl-5-(1-methylbutyl)-2-thiobarbituratsäure (Trapanal; Byk Gulden) [100mg/kg Körpergewicht] und Ketamin HCl [80mg/kg Körpergewicht) narkotisiert und auf einem temperaturregulierten Tisch platziert. Nach dem Öffnen der Bauchhöhle wurde die rechte Niere frei präpariert und die Aorta distal zur rechten Nierenarterie so abgeklemmt, dass die Durchblutung der rechten Niere während der folgenden Einführung der Perfusionskanüle distal zur Klemme nicht beeinträchtigt wurde.

Die Mesenterialarterie wurde abgeklemmt und eine Perfusionskanüle (0,8mm OD) in die abdominale Aorta eingeführt. Nachdem die Klammer entfernt wurde die Kanüle in die Position der rechten Nierenarterie gebracht und fixiert. Die Aorta wurde proximal zur rechten Nierenarterie ligiert und die Perfusion mit einer Anfangs Flussrate von 1ml/min gestartet. Durch dieses Manöver wurde eine Unterversorgung der Niere mit Blut weitgehend umgangen. Anschließend wurde die rechte Niere komplett entnommen und in einer temperierten Feuchtkammer bei konstantem Druck von 90mmHg perfundiert. Der Perfusionsdruck wurde permanent mittels der Perfusionskanüle (Isotec pressure transducer, Hugo Sachs Elektronik) überwacht und das Signal für die Rückkopplungsregelung (SCP 704; Hugo Sachs Elektronik) der peristaltischen Pumpe genutzt. Zuletzt wurde ein Polypropylene Katheter (1,5mm OD) in die Nierenvene eingeführt. Der venös austretende Perfusionsfluss wurde, nach einer vorhergehenden Stabilitätsphase von ca. 15 min, für die Bestimmung der Reninaktivität während des laufenden Versuches alle 2 min über einen Zeitraum von 90sec. gesammelt. Die Proben wurden anschließend 10min bei 1500g zentrifugiert und der Überstand bei -20°C gelagert.

2.10 Zellfärbungen

2.10.1 Lebendfärbung

Für die Färbungen „lebender“ As4.1 Zellen wurde Quinacrine Mustard, ein azidotropher Farbstoff, in einer Konzentration von 1µM verwendet. 20000 As4.1 Zellen wurden in Kammern der für die konfokale Mikroskopie geeigneten Chamberslides ausgesät und ü.N bei Standardbedingungen inkubiert. Etwa 1,5 h vor Versuchsbeginn wurde in den Zellüberstand Quinacrine pipettiert ohne die Zellen weiter zu behandeln. Danach wurde der Überstand vorsichtig abgesaugt, die Zellen einmal mit PBS- Otto gewaschen und anschließend mit DMEM ohne Phenolrot als pH- Indikator bedeckt, da dies sich bei Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen störend auf die Interpretation der Emission auswirken kann.

2.10.2 HRP- Färbung

Die As4.1 Zellen wurden in Chamberslides ausgesät und ü.N. unter Standardbedingungen inkubiert. Am nächsten Tag wurde das Medium abgesaugt, die Zellen mit PBS- Otto vorsichtig gewaschen und nach sorgfältigem Absaugen des Waschpuffers die Zellen mit -20°C kaltem Methanol überschichtet. Die Fixierung der Zellen wurde nach 5 min mit PBS- Otto gestoppt, die Flüssigkeit entfernt und anschließend die fixierten Zellen an der Luft vollständig getrocknet. Um unspezifische Bindungen in der nachfolgenden Antikörperreaktion zu vermeiden wurden die Zellen für 20min mit Blockierlösung bei RT inkubiert. Danach wurden die Zellen mit Waschpuffer gewaschen und nach Absaugen der Lösung mit dem primären Renin Antikörper, 1:100 verdünnt in HRP- Blockierlösung beschichtet. Die Inkubation erfolgte bei 4°C ü.N in einer Feuchtkammer. Am folgenden Tag wurden die Zellen 3 Mal mit Waschpuffer gewaschen und dann für weitere 60min bei RT mit dem biotinylierten Sekundärantikörper, verdünnt 1:200 in HRP- Blockierlösung, inkubiert. Die Präparate wurden wiederum 3 Mal mit Waschpuffer gewaschen und anschließend mit Phenylhydrazin/Waschpuffer für 10min bei 37°C leicht geschüttelt. Nach dem Absaugen des Puffers wurden die Zellen mit einem H₂O₂/Phenylhydrazin/Waschpuffergemisch für weitere 20min bei 37°C unter schütteln inkubiert. Die Präparate wurden erneut mit HRP- Waschpuffer kurz gewaschen und danach der Puffer sorgfältig entfernt. Die Zellen wurden mit ABC-

Lösung (vorbereitet nach Herstellervorschrift) bedeckt und 90min bei RT inkubiert und im Anschluss unter Schütteln 3 Mal mit Waschpuffer gewaschen. Im letzten, farbgebenden Schritt wurden die Präparate mit DAB- Lösung (3,3- Diaminobenzidin-Tetrachlorid-Dihydrat) bedeckt und unter mikroskopischer Beobachtung für ca. 5 min bei RT inkubiert. Gestoppt wurde die Reaktion durch Zugabe von Waschpuffer. Nach einem weiteren 10minütigen Waschschrift wurden die Zellen vollständig von Puffer befreit und mit Glyceringelantine bedeckt. Bei allen Versuchen wurden Negativ-Kontrollen mitgeführt um eine unspezifische Bindung der primären oder sekundären Antikörper ausschließen zu können.

2.11 Durchlicht- und Konfokalmikroskopie

Die Zellen wurden wie oben beschrieben transfiziert und vorbereitet. Die Untersuchungen fanden bei lebenden Zellen unter 10%CO₂ Atmosphäre oder in HEPES gepuffertem Medium statt. Beide Male wurde prinzipiell Medium ohne pH-Indikator verwendet, da dies bei der Detektion der Emission durch Interferenz mit dieser störte. Für die Durchlichtmikroskopie der fixierten Zellen wurden die Proben mit Glycergel oder kurzzeitig PBS beschichtet.

Bei der Detektion der EGFP Emission wurde eine Anregungswellenlänge von 488nm eines Argonlasers und folgenden Hauptfarbteiler bzw. Filterkombinationen verwendet: HFT 488; Bandpass Filter 505-530nm

Die Quinacrine Fluoreszenz wurde durch einen 458nm Argonlaser (HFT 458nm) angeregt, die Emission mit einem Longpass Filter bei 475nm detektiert.

2.12 Durchflusszytometrie (Fluorescence Activated Cell Sorting)

Bei der Durchflusszytometrie handelt es sich um eine Methode, die die Analyse von Fluoreszenz- und Streulicht- Eigenschaften einzelner Zellen in Suspension ermöglicht. Die zu untersuchende Zellsuspension wird über eine Kapillare aufgenommen, mittels Überdruck zum Messpunkt befördert, was eine

Aneinanderreihung der Zellen zur Folge hat. Am Analysepunkt trifft monochromatisches, gebündeltes Licht eines Lasers – in diesem Fall – eines Argonlasers der Wellenlänge 488nm – auf die vereinzelter Zellen. Die Lichtstreuung gibt Aufschluss über die Größe, durch das so genannte „Vorwärts- Streulicht“ (forward light scatter, FSC) und die Granularität durch das „Seitwärts- Streulicht“ (sideward light scatter, SSC) der Zelle. Des Weiteren stehen prinzipiell 4 Kanäle, bedingt durch den Einsatz spezifischer Filtersysteme und Photomultiplier, zur Detektion von emittierter Fluoreszenz zur Verfügung. Diese entsteht durch die Anregung der Fluoreszenzfarbstoffe durch den Laser in bzw. an den zu untersuchenden Zellen. Bei den durchgeführten Untersuchungen wurde dementsprechend die durch das endogen in den Zellen vorhandene EGFP verursachte Emission bei 530nm detektiert und ausgewertet.

Bei den hier durchgeführten Versuchen wurde ein FACSCalibur, BD, Heidelberg verwendet. Die Auswertung der Daten fand anschließend mittels der Softwareanwendung WinMDI 2.8 statt.

Die zu untersuchenden Zellen wurden wie oben beschrieben transfiziert und ü.N bei 37°C; 10%CO₂ inkubiert. Kurz vor Durchführung des Versuches wurden die Zellen mit PBS gewaschen, trypsinisiert und nach entfernen des Trypsins jeweils 2 24er well Ansätze vereinigt und in 500µl PBS gelöst. Die Proben wurden während der gesamten Vorbereitung auf Eis gehalten.

2.13 Statistik

Als statistische Größe wurden die arithmetischen Mittelwerte, deren Standardabweichung (SD) und die statische Schwankung der Mittelwerte (SEM) verwendet. Die einfaktorielle Varianzanalyse (ANVOVA) wurde für interindividuelle Vergleiche und der zweiseitige student's t-test für intraindividuelle Vergleiche verwendet. Die Irrtumswahrscheinlichkeit p wurde bei $p < 0,05$ als statistisch signifikant betrachtet.

III Ergebnisse

Mittels in- vivo und ex- vivo Versuchen sollte gezeigt werden, dass die Prozessierung von Renin selbst, also die Glykosylierung des Proteins und das Abspalten der Prosequenz, eine unerlässliche Voraussetzung für die Möglichkeit der regulierten Freisetzung von aktivem Renin ist. In weiteren Schritten sollte dann ein in- vitro System etabliert werden mit dessen Hilfe die Prozessierungsschritte des murinen Renins auf zellulärer Ebene zukünftig aufgeklärt werden können. Dabei standen vor allem die Charakterisierung eigens generierter Konstrukte und die Verbesserung der Reninvesikelbildung in As4.1- Zellen im Fokus.

1 Charakterisierung der REN1 - und REN2- Mäuse

Ausgangspunkt der Untersuchungen waren genetisch veränderte Mäuse die ursprünglich zwei Formen des Renins exprimierten. Die glykosylierbare Form Renin1^d/(Renin1^c) [REN1] und Renin2 [REN2]. Es handelt sich hier um eine Duplikation des Renin1^d Gens, der die drei potentiellen Glykosylierungsstellen fehlen. Die Tiere wurde durch die Arbeitsgruppe um Ellen S. Pentz (Pentz et al., 2001) genetisch so verändert, dass REN1^d Knock-out Tiere statt Renin1^d das Green Fluorescent Protein und weiterhin unverändert REN2 exprimieren.

Im Zuge dieser Arbeit wurden die homozygoten REN1^{d/-}-GFP Tiere mit wt C57/BL6 Mäusen gekreuzt. Die C57/BL6 Tiere haben nur ein Reningen, das Renin1^c, welches zum Renin1^d der oben genannten Mäuseart identisch ist. Der heterozygote Nachwuchs wurde wiederum verpaart, so dass für die anstehenden Versuche ein Pool an Mäusen mit gleichem genetischen Hintergrund zu Verfügung stand, die homozygot jeweils ausschließlich Renin1 bzw. Renin2 mRNA exprimieren und damit eine gezielte Untersuchung der Unterschiede in der Reninprozessierung im direkten Vergleich ermöglicht wurde.

Weder männlichen noch weibliche REN1/REN2-heterozygote oder REN1- oder REN2-homozygoten Tiere hinsichtlich ihrer Reningenexpression, unterschieden sich im Bezug auf Körpergewicht, der Körpergröße oder der Nierenbeschaffenheit von den Wildtyp Tieren. Des Weiteren war die Anzahl der Nachkommen aus der Verpaarung von Wildtyp und Homozygoten bzw. von Heterozygoten untereinander vergleichbar mit der Anzahl der Nachkommen aus Wildtyp Kreuzungen. Auch Ellen Pentz konnte in ihren Versuchen keinen Unterschied zwischen REN1-, REN1/2- oder REN2- Tieren hinsichtlich Körpergewicht, Körpergröße oder Nierenentwicklung feststellen.(Pentz et al., 2001).

In allen nachfolgenden Versuchansätzen wurde vor Beginn eine Schwanzbiopsie und anschließend eine Genotypisierung mit den spezifischen Primerkombinationen Klar377/378 und Klar377/379 wie in Material und Methoden (2.3.1.) beschrieben durchgeführt.

1.1 Bestimmung des aktiven Plasmarenin

Zunächst wurde untersucht, ob sich der aktive Plasmareninspiegel in normotensiven REN1-, REN1/REN2- bzw. REN2-Tiere aufgrund der vorhandenen genetisch bedingten Reninisoformen unterscheidet.

.

Die Versuchstiere (jeweils n=3) wurden unter Narkose mit der Guillotine dekapitiert und das Blut gesammelt. Die Proben wurden nach Standard Protokoll (Material und Methoden (2.8.3.) für die Bestimmung der Reninkonzentration im Plasma aufbereitet und anschließend vermessen. Bei der Bestimmung der Reninkonzentration handelt es sich um die Bestimmung der Reninaktivität in Anwesenheit eines Überschusses an Reninsubstrat.

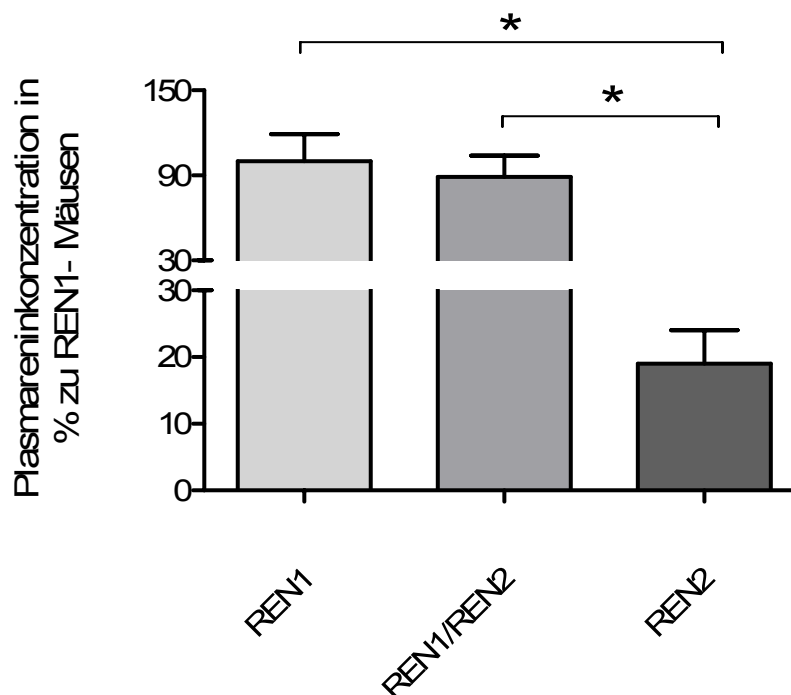


Abbildung 3-1: Plasmareninkonzentration bei homozygoten REN1-, heterozygoten REN1/REN2 und homozygoten REN2 Tieren

Die Experimente zeigten, dass im Plasma (Abb. 3-1) Unterschiede bezüglich der aktiven Renin Konzentration festgestellt werden konnten. Diese war bei den REN2-Tieren um den Faktor 5,3 gegenüber den REN1 - Kontrolltieren und um einen Faktor 4,7 gegenüber den REN1/REN2- Mäusen erniedrigt. Daraus ergab sich die Frage, ob die erniedrigte aktive Plasmareninkonzentration eine Folge verminderter Renin mRNA Abundanz ist oder -ausgehend von der Hypothese, dass eine Umsetzung der mRNA in Protein unbeeinflusst ist- eine verminderte renale Aktivierung und Ausschleusung des Renin2 aufgrund der fehlenden Glykosylierung in den REN2-Tieren der Fall sein könnte.

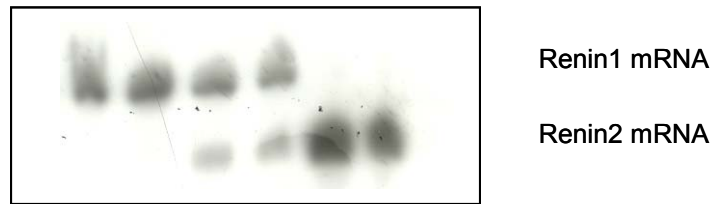
1.2 Quantifizierung der Renin1 bzw. Renin2 mRNA der Niere

Die Reningenexpression der REN1-, REN1/REN2- bzw. REN2-Tiere wurde mittels eines RNase Protection Assays überprüft.

Dazu wurden die Tiere zunächst mit Isofluran leicht narkotisiert und durch Genickbruch getötet, die Nieren frei präpariert und entnommen. Anschließend die Gesamt- RNA nach Standard-Protokoll wie in Material und Methoden 2.3.3.4 und 2.4. beschrieben isoliert und quantifiziert. Die Quantifizierung der Expression erfolgte dabei mittels radiometrischer Messungen.

Wie deutlich in Abb. 3-2 A zu erkennen ist, exprimieren die homozygoten REN1-Tiere, ausschließlich Renin1 mRNA und die homozygoten REN2-Tiere ausschließlich Renin2 mRNA. Während die heterozygoten REN1/REN2 Tiere im RNase Protection Assay sowohl ein positives Signal für Renin1 als auch für Renin2 mRNA zeigen.

A



B

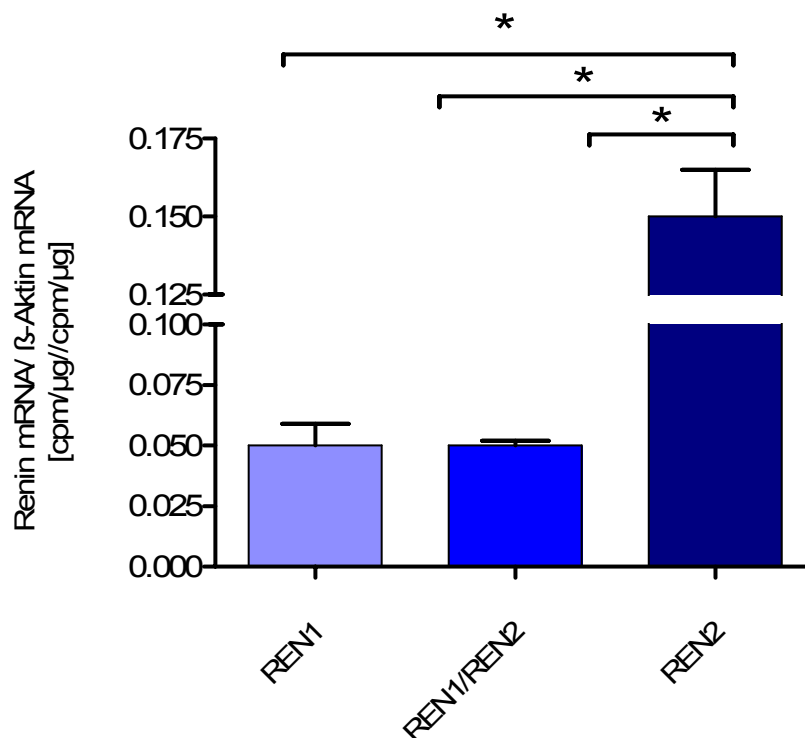


Abbildung 3-2: Expression der Gesamt Renin mRNA in REN1-, REN1/REN2- und REN2- Tieren

A Autoradiographie des RNase Protection Assays unter der Verwendung einer Antisense Probe, die eine Unterscheidung der Renin Isoformen Ren1 /Ren2 ermöglicht.

B Quantifizierung des Hybridisierungssignals. Die Werte geben das Verhältnis der Hybridisierungssignale von Renin- und β-Aktin mRNA derselben Proben wieder. Die Werte sind Mittelwerte \pm SEM aus jeweils 3 Messungen. Die Sterne kennzeichnen Unterschiede mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit $p < 0,05$.

Die Quantifizierung (Abb. 3-2 B) zeigte eine 3-fach höhere Expression der Renin2 mRNA im homozygoten REN2- Tier gegenüber der Renin1 mRNA im homozygoten REN1- bzw. der Gesamt- Renin mRNA im heterozygoten REN1/REN2- Tier.

Bei den heterozygoten Mäusen lässt sich zudem festhalten, dass die Gesamt- Renin mRNA Abundanz vergleichbar mit der der REN1- Tiere ist.

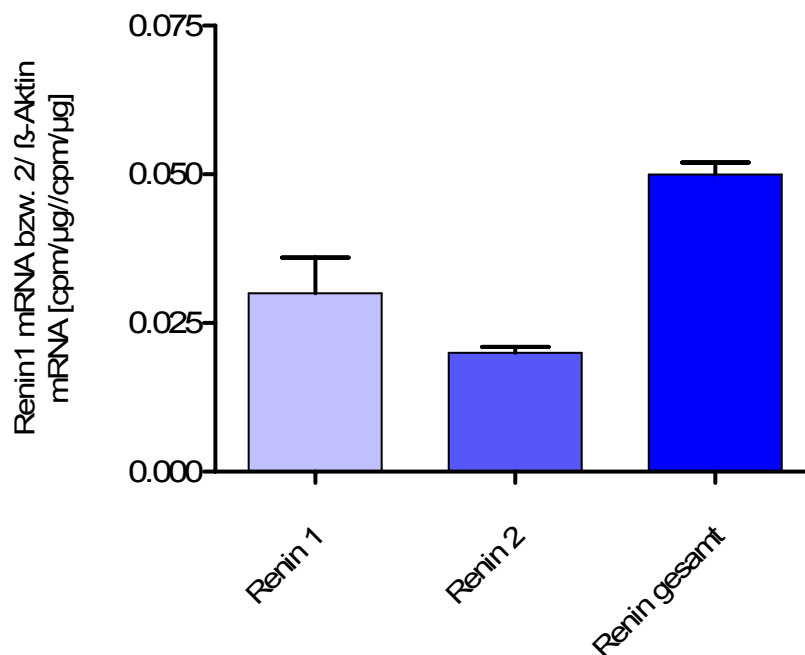


Abbildung 3-3: Expression der Renin mRNA Isoformen in REN1/REN2 Tieren Quantifizierung des Hybridisierungssignals. Die Werte geben das Verhältnis der Hybridisierungssignale von Renin- und β -Aktin mRNA derselben Proben wieder. Die Werte sind Mittelwerte \pm SEM aus jeweils 3 Messungen.

Die Quantifizierung der Reninisofomen Ren1 und Ren2 der heterozygoten Tiere zeigte, dass zu 3/5 Ren1 mRNA und zu 2/5 Ren2 mRNA intrarenal exprimiert wird.

1.3 Weitere in vivo Befunde

Die vorausgegangenen Experimente zeigen, dass die in den C57/BL6 Hintergrund rück gekreuzten REN1-Tiere ausschließlich Renin1 mRNA und die REN2-Tiere ausschließlich Renin2 mRNA exprimieren, wobei die Expression der Ren2 mRNA gegenüber der Ren1 mRNA Abundanz um den Faktor 3 erhöht ist. Auf Proteinebene kehrt sich dieses Phänomen um. Mittels eines AngII- RIAs ließ sich zeigen, dass der aktive Reniningehalt des Plasmas der REN1/REN2- und REN2-Tieren gegenläufig zu den erhobenen mRNA Daten sind.

Die Daten bekräftigen die Vermutung, dass vorangehende Prozessierungsschritte des Renins in REN1-, REN1/REN2- und REN2- Tieren auf unterschiedliche Weise erfolgen. Um dies zu überprüfen wurde mit heterozygoten REN1/REN2- und homozygoten REN2- Tieren klassische Manöver durchgeführt um eine Stimulation der Reninsekretion in vivo zu erreichen. Damit sollte überprüft werden, ob der unterschiedliche Glykosylierungszustand der Reninisoformen sich nachweisbar auf die regulierte Freisetzung, ausgelöst durch die Behandlung der Versuchstiere mit ACE- Hemmer und Niedrigsalz- Diät, auswirkt.

1.3.1 Chronische Stimulation des RAAS

Heterozygote REN1/REN2- Tiere und homozygoten REN2- Tieren (n=3) wurden 7 Tagen lang unter salzarmer Kost (0,02% NaCl) in Kombination mit Ramipril [100mg/L]- haltigem Wasser gehalten, um eine chronische und effektive Stimulation des RAAS zu erzielen.

Nach Ablauf des Versuches wurde die Tiere unter Narkose dakapitiert, das Blut gesammelt und anschließend die Nieren frei präpariert. Die Proben wurden jeweils nach Standard-Protokoll (Material und Methoden 2.8.3. & 2.4.) aufgearbeitet und mittels AngII- RIA bzw. RNase Protection Assays die Reninkonzentration bestimmt (Abb. 3-4) und die Renin mRNA Abundanz (Abb.3-5) quantifiziert.

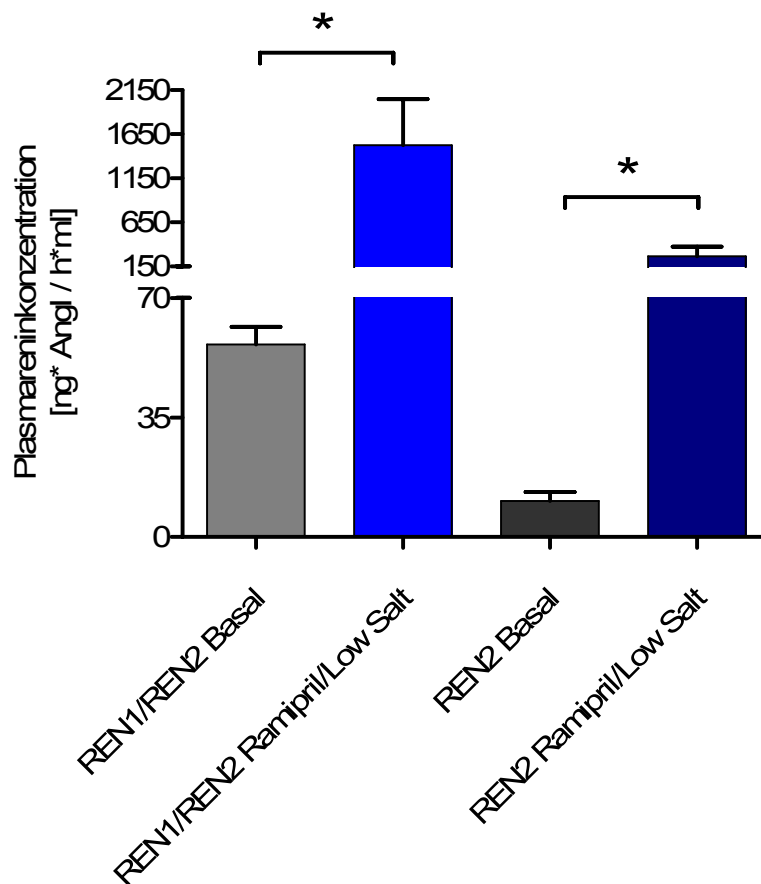


Abbildung 3-4: Aktiver Reningehalt des Plasmas bei REN1/REN2 und REN2 – Tieren unter Kontrollbedingungen und nach einer 7-tägigen Nidrigsalzdiät (0,02% NaCl) und Gabe von Ramipril [100mg/L] haltigem Wasser. Die Werte repräsentieren Mittelwerte \pm SEM von jeweils 3 Messungen. Sterne kennzeichnen Unterschiede mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$.

Bei den homozygot ausschließlich Renin2 mRNA exprimierenden REN2- Tieren, war, wie in Abbildung 3-4 zu sehen, ein 24- fachen Anstieg der aktiven Reninkonzentration im Plasma gegenüber der Kontrollgruppe messbar. Während die REN1/REN2- Tiere auf die chronische Stimulation des RAAS vergleichbar mit einem 27- fachen Anstieg der aktiven Reninkonzentration gegenüber der Kontrollgruppe reagierten.

Jedoch zeigten die REN1/REN2- Tiere auch hier bereits basal eine 5-fach höhere aktive Reninkonzentration im Plasma als die REN2- Tiere.

Parallel dazu wurde die Renin1- und Renin2- mRNA Expression mit Hilfe eines RNase Protection Assays bestimmt.

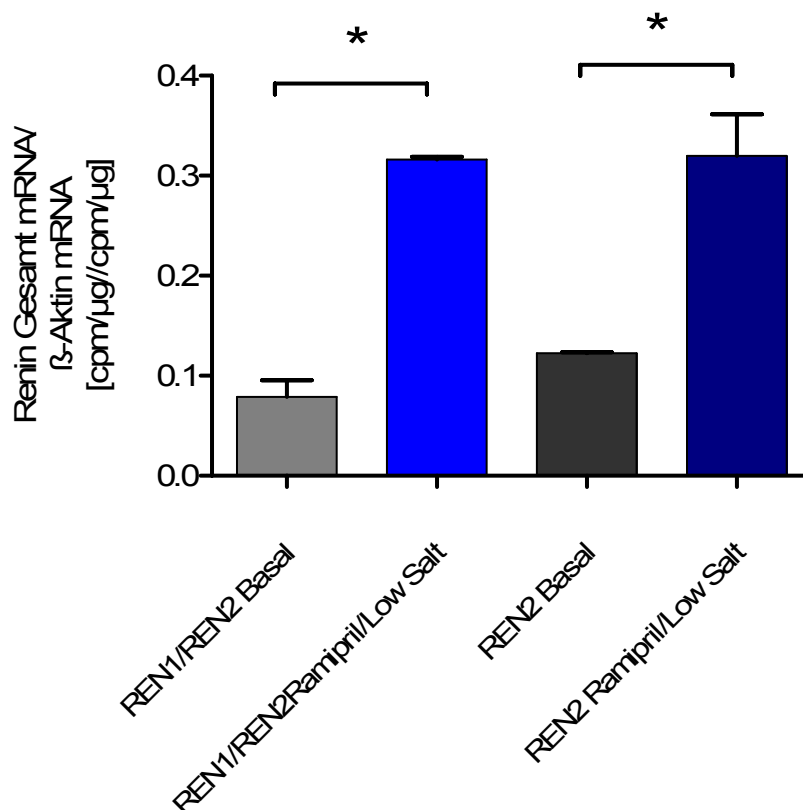


Abbildung 3-5a: Expression der Gesamt- Renin mRNA in REN1/REN2- und REN2- Tieren

Quantifizierung des Hybridisierungssignals. Die Werte geben das Verhältnis der Hybridisierungssignale von Renin- und β -Aktin mRNA derselben Proben wieder. Die Werte sind Mittelwerte \pm SEM aus jeweils 3 Messungen. Die Sterne kennzeichnen Unterschiede mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit $p < 0,05$.

Die Analyse der Renin mRNA in der Niere zeigte bei den heterozygoten Tieren einen Anstieg der Gesamt- Renin mRNA Abundanz (Ren1 und Ren2 mRNA) um den

Faktor 4. Des Weiteren konnte ebenfalls eine Erhöhung der Renin2 mRNA Abundanz um den Faktor 2,6 bei den homozygoten REN2 Tieren gezeigt werden. Die basale Reninabundanz war in diesen Versuchen bei den homozygoten REN2- Tieren um einen Faktor 1,5 gegenüber den heterozygoten REN1/REN2- Tieren erhöht.

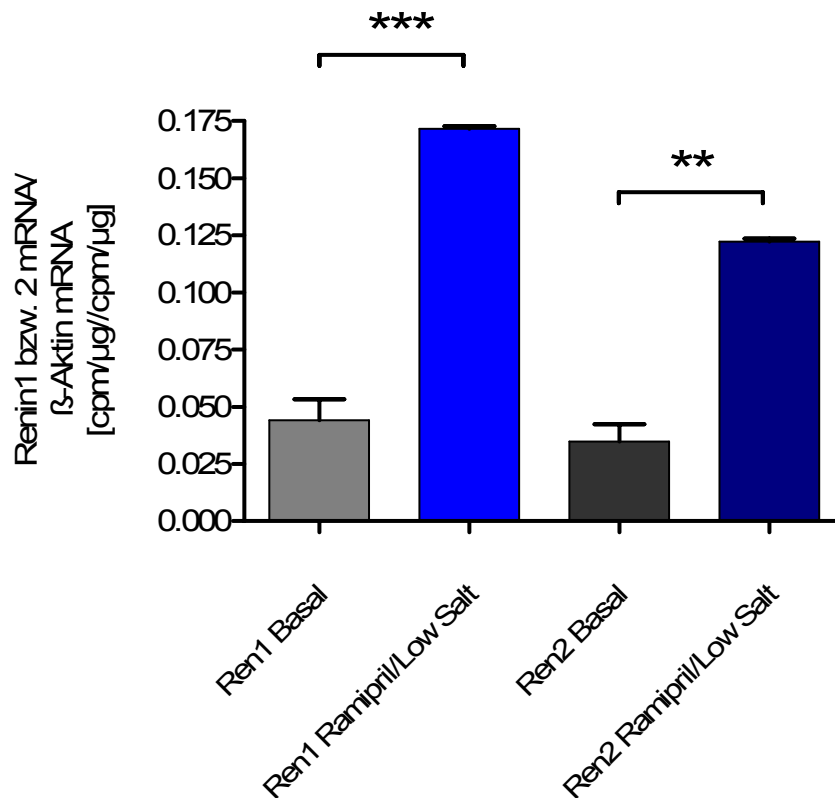


Abbildung 3-5b: Expression der Renin mRNA Isoformen in REN1/REN2-Tieren Quantifizierung des Hybridisierungssignals. Die Werte geben das Verhältnis der Hybridisierungssignale von Renin- und β-Aktin mRNA derselben Proben wieder. Die Werte sind Mittelwerte \pm SEM aus jeweils 3 Messungen. Die Sterne kennzeichnen Unterschiede mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit $p < 0,01$ bzw. $0,001$.

Die Analyse der einzelnen Reninisoformenten in den heterozygoten REN1/REN2-Tieren zeigte, dass sowohl die Abundanz der Ren1 mRNA als auch die der Ren2 mRNA durch die Kombination von Ramipril und einer Nidrigsalz Diät gesteigert werden konnte. Im Falle der Renin1 mRNA um einen Faktor 3,9 und Renin2 mRNA um eine Faktor 4,8.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die chronische Stimulierbarkeit des RAAS sowohl bei den REN1/2-Tieren als auch bei den REN2- Tieren, durch den Einsatz von ACE- Hemmern in Kombination mit einer Niedrigsalz- Diät, auf transkriptioneller Ebene und auf Proteinebene möglich ist. (Abb.3-5a). Allerdings ist auf Proteinebene das Niveau auf dem diese Regulation stattfindet bei den REN2-Mäusen um einen Faktor 5 niedriger als bei den REN1/REN2- Mäusen. Da die chronische Stimulation des RAAS, über einen Zeitraum von sieben Tagen, sowohl die transkriptionelle als auch die sekretorische Ebene umfasst, wurde im folgenden die Stimulation auf 45 min begrenzt um die Effekte einer gesteigerten Transkription der Renin mRNA als Regulationsantwort zu unterbinden.

1.3.2 Akute Stimulation des RAAS

Für die Messung einer akuten Stimulation des RAAS ist es erforderlich die Tiere bereits im Vorfeld besonders gut an die Versuchsbedingungen zu gewöhnen, um eine unerwünschte Stimulation des Renin- Angiotensin- Aldosteron- Systems durch Stress zu vermeiden. Die Tiere wurden dementsprechend in den Tagen vor Versuchsbeginn trainiert.

Am ersten Versuchstag wurde Blut durch Schwanzbiopsie gewonnen (Ren1:n=5; Ren1/Ren2:n=3; Ren2:n=5), das Plasma abgetrennt und bei -20°C zunächst gelagert. 8 Tage später wurde den Tieren intraperitoneal Furosemid [30mg/Kg] appliziert und 45 min nach der Injektion erneut Schwanzblut entnommen und das Plasma gewonnen. Anschließend wurde nach Standardprotokoll der Plasmareiningehalt vor und nach dem Stimulationsmanöver mit Hilfe eines Angl RIAs bestimmt (Material und Methoden 2.8.3).

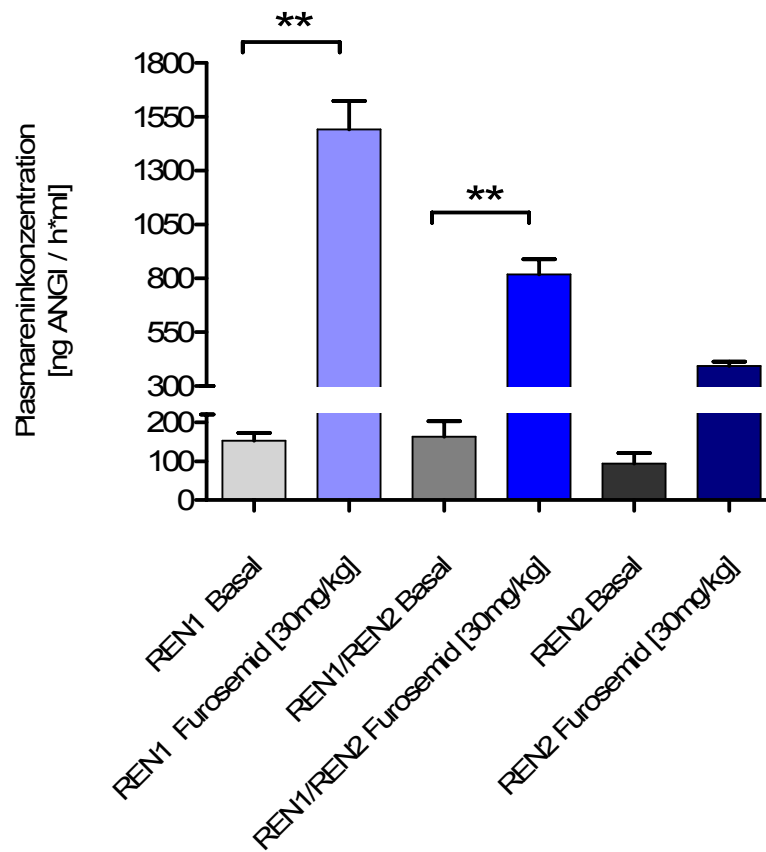


Abb. 3-6: Plasmapareninkonzentration vor und 45 min nach akuter Stimulation des RAAS durch i.p. Applikation von Furosemid. Die Werte sind Mittelwerte \pm SEM aus REN1:n=5; REN1/REN2:n=3; REN2:n=5 Messungen. Die Sterne kennzeichnen Unterschiede mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit $p < 0,01$

Wie in Abbildung 3-6 zu erkennen ist konnte bei allen Tieren durch die akute Stimulation eine Erhöhung der Reninkonzentration im Plasma erreicht werden. Allerdings fiel diese bei den REN1- Tieren mit einem Faktor von 9,8 gegenüber den Heterozygot REN1/REN2 exprimierenden Tieren mit 5,0 und den REN2- Tieren mit einer Steigerung der aktiven Reninkonzentration im Plasma um einen Faktor 4,2 deutlich höher aus.

1.4 Reninfreisetzung aus der isoliert perfundierten Niere (ex- vivo)

Die Reninsekretion lässt sich sowohl in den REN1-, die nur Renin1 exprimieren, als auch in den REN2- Mäusen, die nur Renin2 exprimieren, durch physiologische Manöver wie der Hemmung des Angiotensin- Converting- Enzyms oder durch den Einsatz von Schleifendiuretika - wenn auch auf unterschiedlichen Ebenen –steigern. Interessant war hier vor allem der Befund, dass bei akuter Stimulation die Freisetzung von aktivem Renin bei den REN2-Mäusen wesentlich geringer ausfiel als bei den REN1- bzw. REN1/REN2- Tieren. Dies könnte auf eine gestörte endogene Aktivierung des unglykosylierten Renin2 Proteins in den Zellen hinweisen. Daher wurde im Folgenden untersucht, inwiefern es sich bei diesem Manöver tatsächlich um eine regulierte Freisetzung aktiven Renins aus den juxtaglomerulären Zellen der REN1- bzw. REN2- Tiere handelt oder ob eventuell erst im Plasma der Tiere eine Aktivierung des Renins durch systemische Faktoren statt findet.

Für folgende Untersuchungen wurde das Modell der isoliert perfundierten Niere gewählt. Die Niere wird nach entsprechender Vorbereitung mit einem definierten Puffer perfundiert und der Perfusionsdruck, der einen wesentlichen Kontrollmechanismus der Reninsekretion darstellt, während des gesamten Versuchsablaufes elektronisch konstant gehalten. In Gegensatz zu in vivo Experimenten, kann dementsprechend in der isoliert perfundierten Niere die renale Reninsekretion unter definitivem Ausschluss systemischer Regulationsmechanismen untersucht werden. Daraus folgt, dass die Reninsekretion als direkter Effekt auf das Perfusat und dessen Zusammensetzung, das den arteriellen Blutfluss simuliert, verstanden werden kann. Das venös wieder aus der Niere tretende Perfusat wird gesammelt und anschließend auf Reninaktivität hin untersucht.

Die Nieren der Mäuse wurden wie in Material und Methoden 2.9 beschrieben präpariert. Im laufenden Versuch wurde der Druck jeweils konstant auf 90mmHg gehalten, der venöse Fluss notiert und Proben jeweils in 2 Minuten Abständen entnommen. Die Zusätze des Perfusats unterschieden sich während der verschiedenen Manöver wie folgt. Die Reninkonzentration wurde durch einen Angl

RIA bestimmt und anschließend daraus zusammen mit der Flussrate des Perfusats und des jeweiligen Nierengewichtes die Reninsekretionsrate berechnet.

Das Basis Perfusat bestand jeweils aus einer modifizierten Krebs- Henseleit Lösung (Material und Methoden 2.9), ergänzt mit Rinder Albumin (6g/100mlPerfusat) und humanen roten Blutkörperchen (10% Hämatokrit). Die Stocklösungen an Isoproterenol wurden dem jeweils frisch präparierten Perfusat unmittelbar vor Versuchsbeginn zugesetzt. Um die Kalziumkonzentration des Perfusats zu vermindern wurde dem Perfusat der Kalzium- Chelator EGTA (Ethylenglykol-bis(aminoethylether) Tetraessigsäure) 3,1 mMol/L zugesetzt.

Im Folgenden wurde Isoproterenol zur Stimulation der Reninfreisetzung gewählt, das als klassischer Stimulator des RAAS und somit der Reninsekretion etabliert ist.

1.4.1 Effekt von Isoproterenol [10nM] auf die Reninsekretion

Isoproterenol wirkt Rezeptorvermittelt, über β - Adrenorezeptoren, auf die Adenylatzyklase und führt damit zu einer schnellen Erhöhung des intrazellulären cAMP- Spiegels. Dies wiederum hat eine Erhöhung der Reninfreisetzung zur Folge.

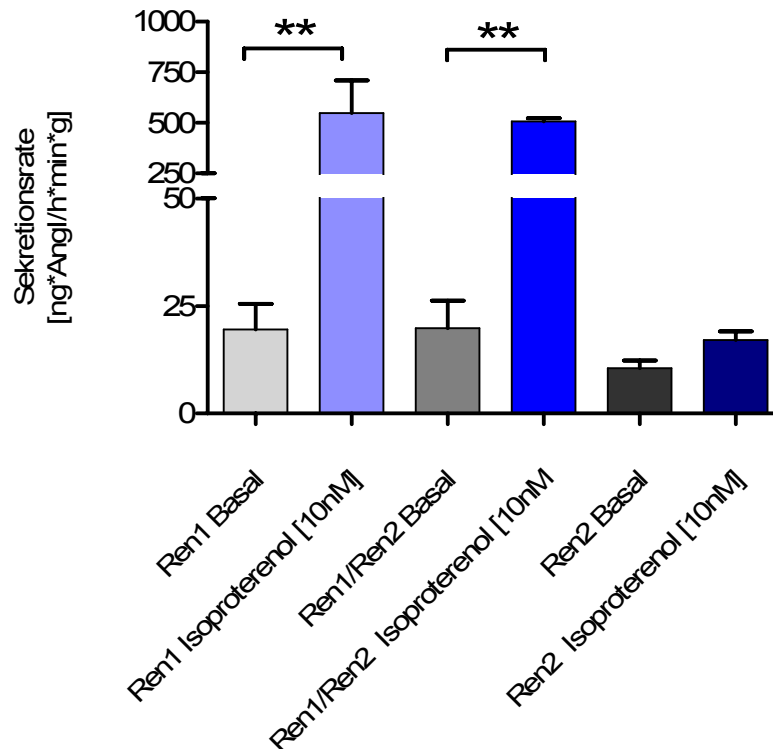


Abb. 3-7: Bestimmung der Reninsekretionsrate bei REN1-, REN1/2- und REN2- Tieren nach Gabe von Isoproterenol [10nM]. Die Werte sind Mittelwerte \pm SEM aus REN1:n=7; REN1/REN2:n=3; REN2:n=5 Messungen. Die Sterne kennzeichnen Unterschiede mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit $p < 0,01$

Wie in Abbildung 3-7 zu erkennen ist lässt sich bei den REN1- und den REN1/REN2- Tieren eine signifikante Steigerung der Reninsekretionsrate um den Faktor 28 bzw. 26 durch das Isoproterenol Manöver erreichen. Was gut zu den Plasmarenin Daten der chronischen und akuten Stimulations- Experimente passt.

Die Bestimmung der Reninsekretionsrate der REN2 isoliert perfundierten Nieren zeigen jedoch, dass eine Stimulation durch Isoproterenol keine Wirkung auf die Freisetzung aktiven Renins aus der Niere hat. Dies untermauert die anfangs gestellte Hypothese, dass das Renin2 aufgrund der fehlenden Glykosylierung nicht endogen aktiviert wird.

Diese Hypothese soll unter anderem mit dem im folgendem etablierten System geklärt werden können.

2 Untersuchung der Reninprozessierung auf zellulärer Ebene (in vitro)

Die ex- vivo Versuche haben eindeutig gezeigt, dass aktives Renin², die unglykosylierte Isoform des Renin¹ Proteins, nicht durch die bekannten, klassischen Manöver reguliert freigesetzt werden kann. Um die Hypothese, dass dieses Phänomen auf die fehlende Glykosylierung zurückgeführt werden kann, in zukünftigen Versuchen klären zu können, war ein weiteres Ziel dieser Arbeit ein in-vitro System zu etablieren, mit dessen Hilfe der Ablauf der zellulären Reninprozessierung dargestellt werden kann.

Als Ausgangszellsystem wurde die murine Zelllinie As4.1 gewählt, da es sich hier um immortalisierte, juxtaglomeruläre Zellen handelt, die endogen die glykosylierte Form des Renin exprimiert und dabei unter den bekannten klassischen cAMP und Kalzium Manövern auch entsprechend reagieren. Eine ideale Voraussetzung für die Etablierung eines in- vitro Systems mit dessen Hilfe die Prozessierung des murinen Renins möglichst nahe an den tatsächlichen in- vivo Abläufen der Niere untersucht werden kann.

Um den Weg des Renins, während der Prozessierung und der Vorbereitung zur Sekretion, in der Zelle sowohl biochemisch als auch optisch in Echtzeit verfolgen zu können sollte das Reninprotein direkt markiert werden. Dabei fiel die Wahl auf das so genannten **Enhanced Green Fluorescent Protein**, kurz EGFP. Durch das Generieren von entsprechenden Konstrukten sollten in Zellkultur Fusionsproteine translatiert werden, deren Lokalisation dann in der Zelle durch die Detektion des angeregten EGFPProteins möglich wird.

2.1 Konstrukte

Als Grundvektor diente bei allen Renin- EGFP Konstrukten ein CMV getriebenes EGFP Plasmid. Die Generierung der Konstrukte erfolgte durch Klonieren der entsprechenden cDNA Sequenzen in die Multiple Cloning Site des Vektors. Dabei wurden die Schnittstellen so gewählt, dass sich die EGFP Sequenz in frame an den C- Terminus der REN1 Gensequenz anschloss, wodurch gewährleistet wurde, dass bei Expression des Konstruktes ein Fusionsprotein aus Präprorenin und EGFP entsteht.

Da Präprorenin1 bekanntlich drei potentielle Glykosylierungstellen Asn69, Asn139 und Asn320 besitzt, die entscheidend zur Prozessierung des Proteins beitragen können, wurden verschiedene Mutationskonstrukte generiert, durch deren Einsatz die Beteiligung der Stellen alleine oder in Kombination überprüft werden sollen. Die in der Arbeit verwendeten Mutationskonstrukte wurden ausgehend vom Grundkonstrukt pRen1EGFP generiert. Das Einführen von Punktmutationen in die Gensequenzen zielte dabei auf einen gerichteten Aminosäureaustausch. Dadurch konnten die drei potentiellen Glykosylierungsstellen des Ren1EGFP Proteins, alleine oder in Kombination so verändert werden, dass eine ursprüngliche Glykosylierung des Proteins, entsprechend der jeweiligen Mutation, nicht mehr möglich war.

Da nicht nur die Glykosylierung eine große Rolle bei der Prozessierung des Renins spielen kann, sondern auch das Prosegment entscheidend an den Prozessen beteiligt sein kann, wurden, wie im Folgenden beschrieben, weitere Mutationskonstrukte generiert. Es wurden Schnittstellen eingeführt, die in mehreren Schritten eine Deletion der Prä- bzw. Prosequenz in den REN1 Gensequenzbereichen der Konstrukte ermöglichte.

Für anstehende vergleichende Untersuchungen der Renin1 und Renin2 Prozessierung wurde das Renin2 Gen ebenfalls in einen pEGFP-N1 Grundvektor kloniert. Dies erfolgte im Zuge dieser Arbeit nach dem für pRen1EGFP oben beschriebenen Prinzip und lieferte so ein Fusionsprotein aus Präprorenin2 und EGFP.

2.1.1 Transfektionseffizienz und Fluoreszenzintensität

Um für alle folgenden Experimente eine vergleichbare Expression der generierten Konstrukte gewährleisten zu können, wurde zunächst überprüft, ob primär alle Konstrukte transient in den As4.1 Zellen exprimiert werden und ob es dabei im Bezug auf die Transfektion der jeweiligen Konstrukte in die Zellen Unterschiede in der Effizienz gibt.

Für die optischen Untersuchungen war eine weitere Voraussetzung, dass die Fusionsproteine in ihrer Fluoreszenzintensität keine Unterschiede aufweisen, da nur so vergleichende Studien durchgeführt werden können. Außerdem könnten die eingeführten Mutationen der Konstrukte zu einer abgewandelten Konformation der unterschiedlichen Fusionsproteine führen. Dies würde sich in einer verminderten Fluoreszenzintensität äußern. Daher wurde auch die Intensität der mutierten Fusionsproteine im direkten Vergleich dem Ren1EGFP überprüft.

Für diese Versuche wurden die As4.1- Zellen ausgesät und mit den jeweiligen Konstrukten transfiziert. Nach dem Ernten der Zellen wurden sie für die FACS-Analyse präpariert. Als negative Kontrolle dienten nur mit FuGENE6 inkubierte Zellen, um eine eventuell störende Autofluoreszenz ausschließen zu können. Die Transfektion der Zellen mit dem unveränderten pEGFP-N1 Grundvektor stellte die positive Kontrolle dar.

Die Effizienz der Transfektion der Konstrukte in As4.1 Zellen wurde mit Hilfe der Durchflusszytometrie bei einer Anregungswellenlänge von 488nm ermittelt. Die Werte repräsentieren jeweils die Mittelwerte aus drei Versuchsansätzen und dabei

den Anteil der transfizierten Zellen bezogen auf die Gesamtzellzahl der jeweiligen Analyse Ansätze. Die Transfektionseffizienz der pRen1EGFP Konstrukte wurde auf 100% gesetzt und alle anderen Konstrukte anschließend auf Ren1EGFP bezogen.

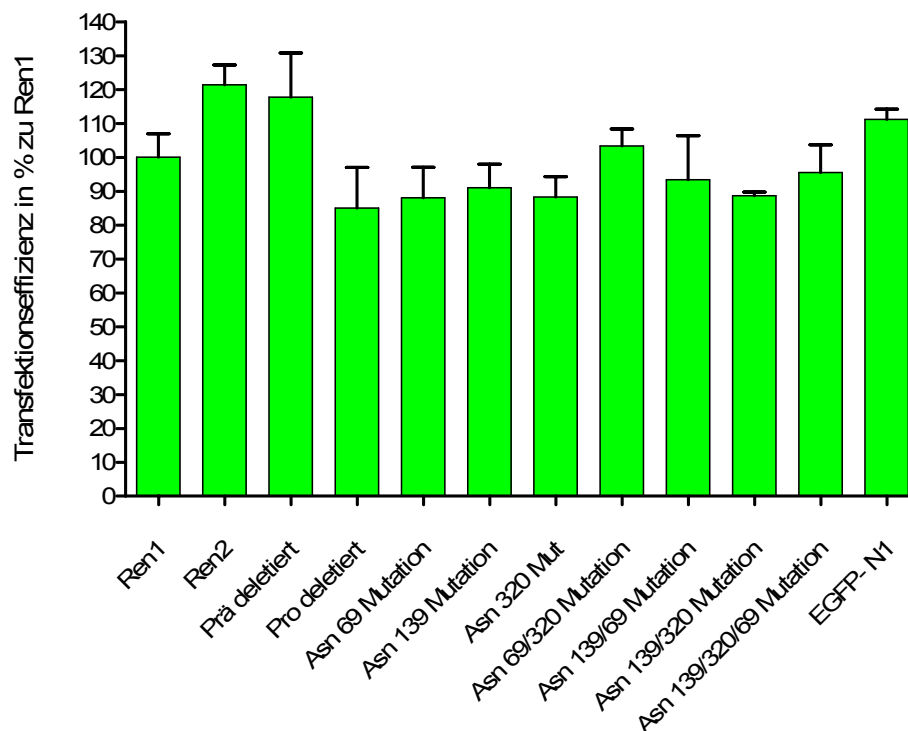


Abb.3-8 : Transfektionseffizienz der Konstrukte in As4.1 Zellen.
Die Werte repräsentieren Mittelwerte +/- SEM von jeweils 3 Messungen.
Sterne kennzeichnen Unterschiede mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ gegenüber pRen1EGFP transfizierter Zellen.

Die Abbildung 3-8 zeigt deutlich, dass die Transfektionseffizienz der einzelnen Plasmide in As4.1 Zellen keinerlei Unterschiede aufweist.

Um Aussagen über die mittlere Fluoreszenzintensität der einzelnen Ansätze treffen zu können wurden alle Zellen, die als transfiziert identifiziert wurden bezüglich ihrer Fluoreszenz quantifiziert und das Ergebnis dann durch die Anzahl der Zellen gemittelt (Abb. 3-9).

Die mittlere Fluoreszenzintensität der Ren1 Fusionsproteine mit EGFP in den Zellen wurde auf 100% gesetzt und alle anderen Intensitäten anschließend auf Ren1EGFP bezogen.

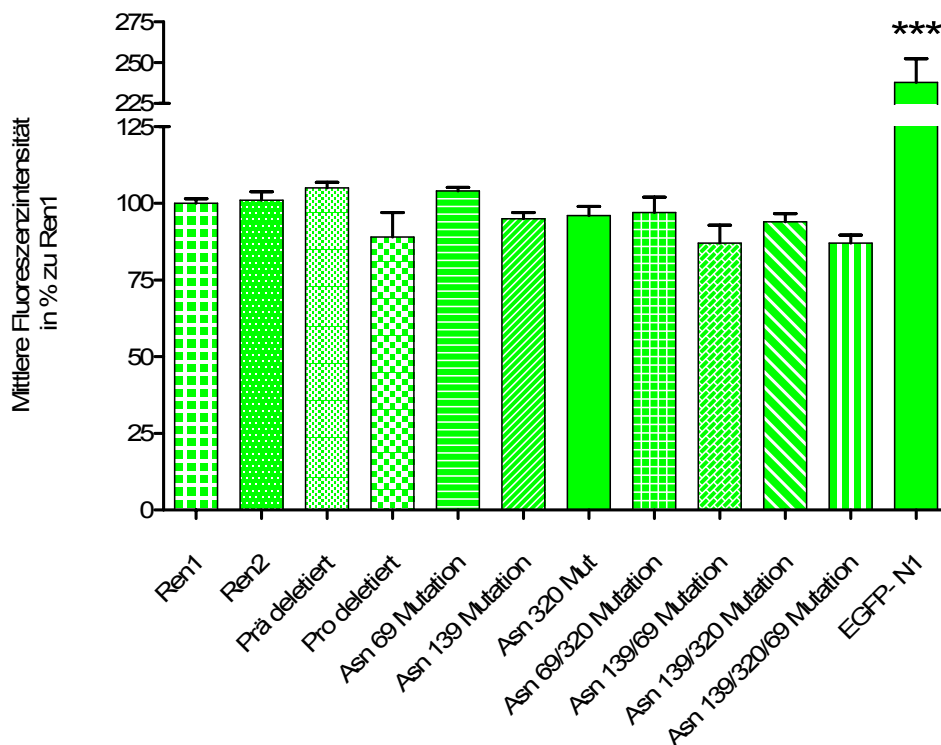


Abb. 3-9: Mittlere Fluoreszenzintensität der transfizierten As4.1 Zellen. Die Werte repräsentieren Mittelwerte \pm SEM von jeweils 3 Messungen. Die Sterne kennzeichnen Unterschiede mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,001$ gegenüber pRen1EGFP (und allen anderen transfizierter Zellen).

Vergleicht man die mittlere Fluoreszenzintensität der pEGFP transfizierten Zellen mit der der pRen1- bzw. pRen2EGFP transfizierten Zellen kann man einen deutlichen Unterschied erkennen. Die Fusionsproteine lagen mit ihrer mittleren Fluoreszenzintensität in allen Versuchen etwa einen Faktor 2,4 unter der mittleren Fluoreszenzintensität des ursprünglichen EGFP Chromophors.

Die quantitative Überprüfung der Effizienz der generierten Konstrukte bezüglich ihrer Transfektion in As4.1 Zellen und der Nachweis der mittleren Intensität der in den Zellen lokalisierten EGFP- Fusionsproteine lieferte Ergebnisse, die einen Einsatz in weiter führenden Versuchen ermöglichte.

2.1.2 Biochemischer Nachweis der Fusionsproteine

Eine weitere wichtige Voraussetzung für die Etablierung eines in- vitro Systems war die Möglichkeit die Fusionsproteine auf biochemischer Ebene nachweisen zu können. Wenn durch optische Studien bereits eine veränderte Lokalisation der mutierten Fusionsproteine gezeigt werden kann wäre es sofort möglich durch Aufreinigen und Fraktionieren der Zellkompartimente fundierte Aussagen über die Lokalisation der Fusionsproteine zu treffen. Dadurch könnten die Wege der intrazellulären Reninprozessierung in Abhängigkeit von dem Glykosylierungszustand der eingesetzten Fusionsproteine experimentell ermittelt werden. Des Weiteren ist die Untersuchung der Renin Freisetzung, als letzten Schritt der Reninprozessierung, so auch gewährleistet.

Dazu wurden die Konstrukte nach Standardprotokoll transfiziert, nach 18h das Medium gewechselt und nach weiteren 24h die Zellen entsprechend für die Proteingewinnung präpariert. Nach der Bestimmung des Proteingehalts der Lysat Proben wurden diese mittels SDS-Page elektrophoretisch aufgetrennt, geblottet und durch spezifischer primärer EGFP- Antikörper nachgewiesen (Material und Methoden 2.2.2. und 2.7).

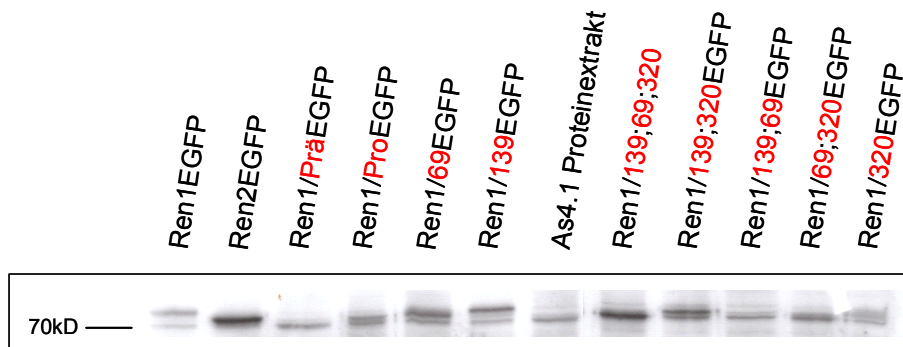


Abb. 3-10: Nachweis der Expression der Fusionsproteine in As4.1- Zellen mittels Western Blot Analyse.

Aufgetragen wurden 50µg Lysat Gesamtprotein. Der spezifische Nachweis erfolgt mit Anti- GFP Serum und Peroxidase gekoppelten sekundären Antikörpern.

Wie in Abbildung 3-10 zu erkennen ist, lassen sich die EGFP Fusionsproteine nach der Transfektion der jeweiligen Plasmide im Lysat eindeutig nachweisen. Die unterschiedliche Laufhöhe lässt sich durch den abweichenden Glykosylierungszustand der jeweiligen Fusionsproteine erklären. Die glykosylierten Formen des Renins liegen bei 44- 48 kDa; Das EGF- Protein entspricht 27kDa.

Des Weiteren war von Interessen, ob die Fusionsproteine aus der Zelle geschleust werden können. Dazu wurden in einem Vorversuch Zellen mit dem Kontroll- Plasmid pRen1EGFP, wie in den oben genannten Versuchsansätzen, transfiziert, nach einmaligem Wechsel des Mediums der jeweilige Überstand gesammelt und 1ml auf 150µl Probenvolumen einrotiert (Material und Methoden 2.7).

Der Nachweis der Fusionsproteine im Überstand konnte nicht erfolgen. Weder in der oben genannten Versuchsanordnung noch nach Auftragen einer Proben- Verdünnungsreihe. Dies wurde darauf zurückgeführt, dass durch das verwendeten 5% FCS (fetal calw serum)- haltigen Zellkulturmedium eine großer Proteinmenge bei der elektrophoretischen Auftrennung etwa auf gleicher Höhe der erwarteten ReninEGFP Fusionsproteine mit läuft und dadurch die gezielte Detektion durch die spezifischen EGFP- Antikörper erschwert wird. Um dies zu umgehen sollte die Konzentration an fetalem Kälberserum reduziert werden.

Fetales Kälberserum enthält eine Reihe von Wachstumsfaktoren, die für die verschiedensten Prozesse in der As4.1- Zelle unerlässlich ist. Daher war es notwendig, die Menge an fetalem Kälberserum so weit zu reduzieren, dass ein geregeltes Wachstum der Zellen noch gewährleistet ist und die Reningenexpression nicht beeinträchtigt wird aber der Proteingehalt so weit eingeschränkt wird, dass ein Nachweis der Fusionsproteine im Western Blot möglich wird.

Die Zellen wurden in mehreren Versuchsansätzen unterschiedlichen Konzentrationen an FCS- haltigem Medium ausgesetzt und die unterste Grenze der möglichen Reduktion bei einem Anteil von 0,1% FCS am Zellkulturmedium ermittelt. Ausschlaggebend waren dabei die Vitalität der Zellen (Wachstumsrate) und vor allem die Reningenexpression und die Regulierbarkeit derselben.

Die Abbildung 3-11 zeigt die relative Renin mRNA Abundanz unter Kontrollbedingungen (5%FCS Medium) gegenüber der veränderten Ausgangssituation (0,1% FCS Medium)

Die Wachstumsrate (nicht dargestellt), die Reningenexpression bzw. die Stimulation durch Forskolin in Kombination mit IBMX (Initiierung des cAMP- Signalweges) blieben von der Erniedrigung des FCS Anteils auf 0,1% im Medium weitgehend unbeeinflusst (Abb. 3-11). Was den reduzierten Einsatz für weitere Versuche rechtfertigte.

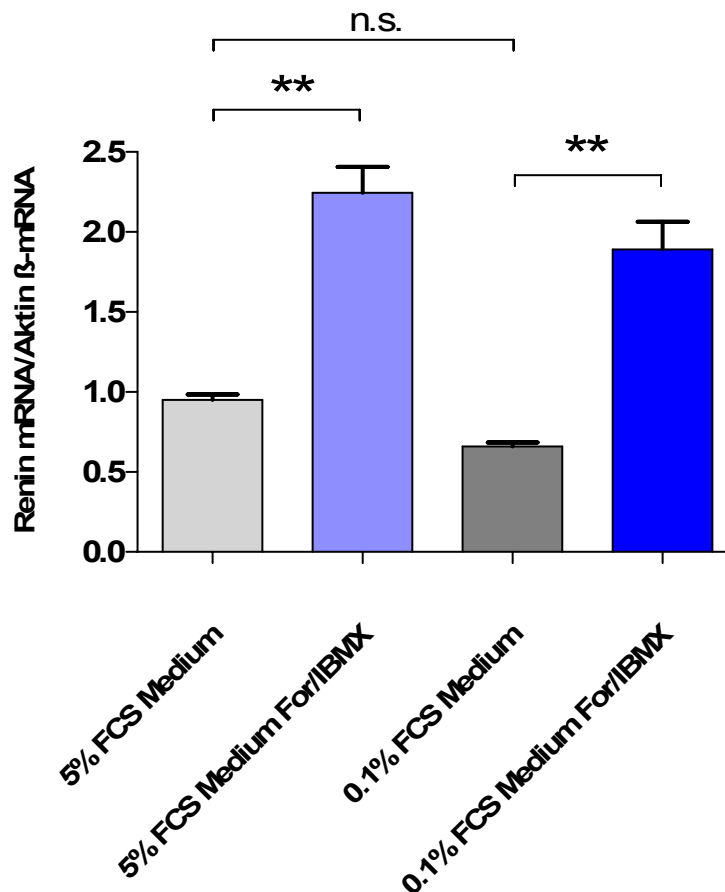


Abb. 3-11: Expression der Renin mRNA As4.1- Zellen während der Inkubation mit 5% FCS und 0,1% FCS- haltigem Kulturmedium und unter Stimulationsbedingungen.

Die Zellen wurden im Vorfeld bereits in 5% bzw. 0,1% FCS Medium kultiviert. 24h nach dem Aussäen der Zellen wurde diese für weitere 18h mit Forskolin [5 μ M] und IBMX [100 μ M] inkubiert und anschließend nach Standardprotokoll die mRNA isoliert und quantifiziert. Die Werte sind Mittelwerte \pm SEM aus jeweils 3 Messungen. Die Sterne kennzeichnen Unterschiede mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,001$ gegenüber der Kontrolle.

Der ursprüngliche Versuch wurde nun, wie oben beschrieben wiederholt und die transfizierten Zellen abschließend 24h in 0,1% FCS Medium inkubiert. Die Überstände wurden gesammelt und jeweils 1ml auf ein Probenvolumen von 150 μ l einrotiert. Die Zellen wurden lysiert und entsprechend aufbereitet. Anschließend wurden alle Proben mittels SDS-Page elektrophoretisch aufgetrennt, geblottet und durch spezifische primärer EGFP- Antikörper die ReninEGFP Proteine detektiert (Material und Methoden 2.7).

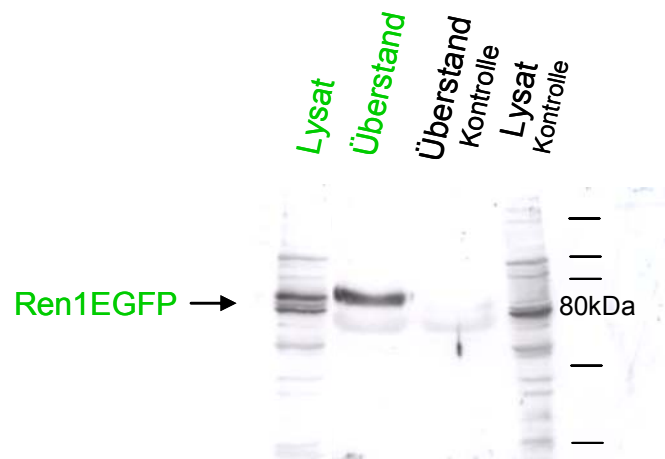


Abb.3-12: Expressionsnachweis Ren1EGFP in Zelllysate und -überstand mittels Western Blot Analyse.

Aufgetragen wurden jeweils 50µg Gesamtprotein. Der spezifische Nachweis erfolgt mit Anti- GFP Serum und Peroxidase gekoppelten sekundären Antikörpern.

Die Abbildung 3-12 zeigt die Western Blot Analyse der transfizierten und der Kontrollzellen im direkten Vergleich. Die Expression des Ren1EGFP ließ sich im Zelllysate und Überstand eindeutig bei einer Laufhöhe von 75kDa nachweisen.

2.1.3 Intrazelluläre Lokalisation des Renins

Parallel dazu wurden die Fusionsproteine Ren1EGFP in der Zelle optisch untersucht. Dabei wurde überprüft, ob diese in der Zelle eindeutig lokalisiert werden können. Im Folgenden wurden nach der Transfektion lebende Zellen experimentell bearbeitet.

Zunächst wurden in einem Vorversuch As4.1 Zellen in Chamberslides mit pEGFP (Kontrollvektor) und pRen1EGFP nach dem in dieser Arbeit entwickeltem

Standardprotokoll (Material und Methoden 2.2.2) transfiziert. Dabei wurde **Dulbecco's Modified Eagle Medium** (DMEM) ohne pH- Indikator verwendet. Dies sollte eventuelle Störungen der emittierten Fluoreszenz durch das im Medium enthaltene Phenolrot von vornherein ausschließen. Die Zellen wurden dann wie in Material und Methoden 2.11 beschrieben für die konfokale Mikroskopie vorbereitet.

In Abbildung 3-13 kann man in der lebenden Zelle eine Verteilung des EGFP Proteins in der gesamten Zelle beobachten. Das Fluoreszenzprotein befindet sich aufgrund der fehlenden ER- Signalsequenz im Plasma der Zellen.

Die Transfektion des generierten Konstrukts pRen1EGFP führt dagegen zu einer deutlich veränderten Lokalisation des gebildeten Fusionsproteins. Es lässt sich gegenüber dem frei im Plasma zirkulierenden EGFP eine gewissen Strukturierung, die durch den Einschluss der Fusionsproteine in Zellorganellen bedingt ist, erkennen. Dies lässt sich gut durch die in der Präsequenz des pRen1EGFP vorhandenen Information für ein Einschleusen in den sekretorischen Weg aller eukaryontischen Zellen erklären.

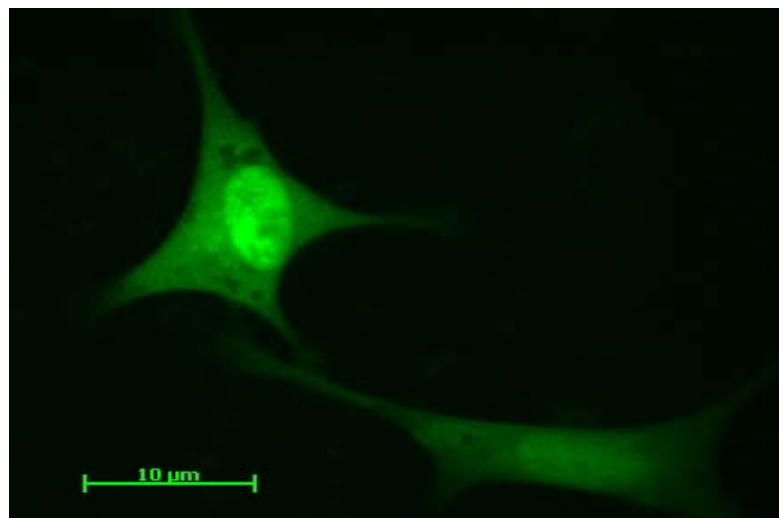


Abb. 3-13: As4.1 Zellen transfiziert mit pEGFP-N1 (Kontrollvektor). Die Aufnahme der lebenden Zelle erfolgte nach 20h Inkubation, unter 10%CO₂ Begasung, bei 37°C. Die Aufnahme erfolgte mit Hilfe des LSM 510 bei einer Anregungswellenlänge (Argonlaser) von 488nm, 63X/1,4 Oil.

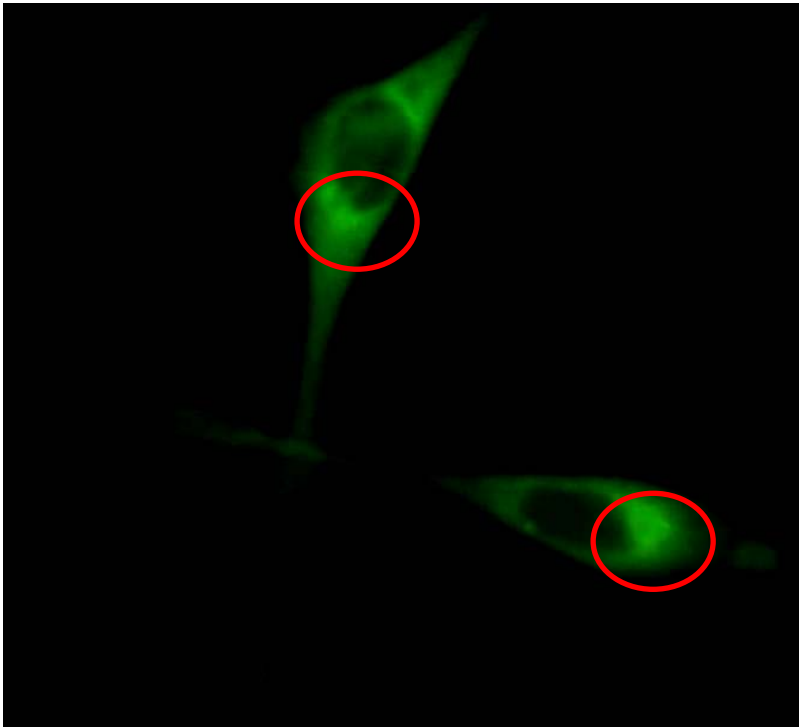


Abb. 3-14: As4.1 Zellen transfiziert mit pRen1EGFP.
Die Aufnahme der lebenden Zelle erfolgte nach 20h Inkubation, unter 10% CO₂ Begasung, bei 37°C. Die Aufnahme erfolgte mit Hilfe des LSM 510 bei einer Anregungswellenlänge (Argonlaser) von 488nm; 63X/1,4 Oil.

Allerdings fehlte eine deutliche Abgrenzung der ReninEGFP Vesikel in der Zelle. Dies stellte aber eine Voraussetzung für die Möglichkeit der visuellen Verfolgung der Vesikel- von ihrer Abschnürung am Trans- Golgi- Netzwerk (TGN), ihrem Weg zur Plasmamembran, bis hin zur Verschmelzung mit dieser und einem damit verbundenen Freisetzen der Fusionsproteine dar. Um ausschließen zu können, dass es sich bei der fehlenden ReninEGFP Vesikel Bildung um ein Problem handelt, welches durch die Fusionsproteine selbst bedingt ist, wurde eine spezifische Renin HRP- Färbung (Material und Methoden 2.10.2) an Methanol fixierten Zellen As4.1- Zellen durchgeführt. Jedoch konnte auch hier keine distinkte Reninvesikelbildung gefunden werden (Abb. 3-15).

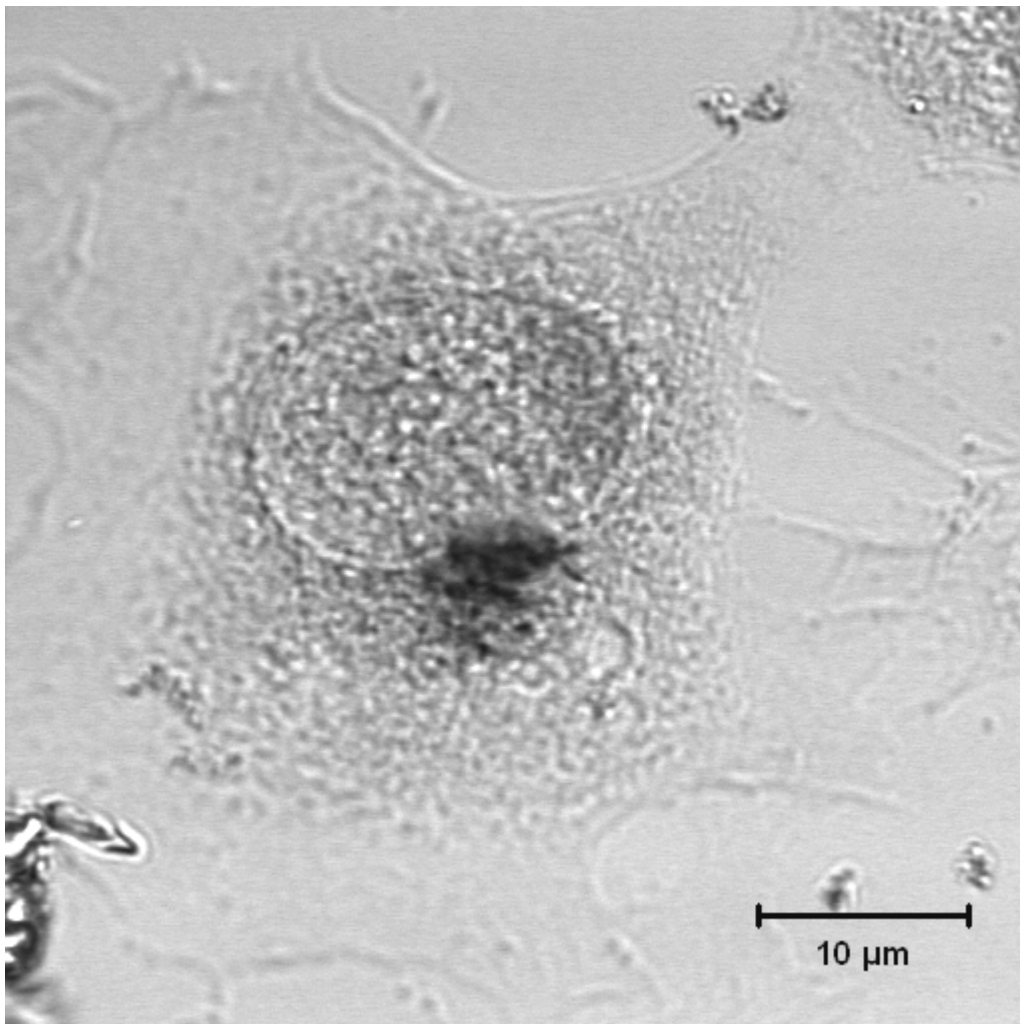


Abb. 3-15: Renin HRP- Färbung in Methanol fixierten As4.1 Zellen. Die Aufnahme erfolgte am LSM510; bei Durchlicht; 63X/1,4 Oil.

Bei einem direkten Vergleich der Renin HRP- Färbung der Zellen mit den transfizierten Zellen ließ sich im perinukleären Bereich sowohl eine Renin als auch eine ReninEGFP Anhäufung feststellen. Die legte die Vermutung nahe, dass die beschriebenen Färbungen durch eine Anhäufung des Renins/ReninEGFPs im bzw. in der Nähe des Trans- Golgi- Netzwerk zustande kommt. Eine spezifische Färbung des Trans- medialen Golgi- Bereichs der Zelle durch die Transfektion eines pECFP- Golgi Vektor konnte diese Vermutung im direkten Vergleich der Färbungen bestätigen.

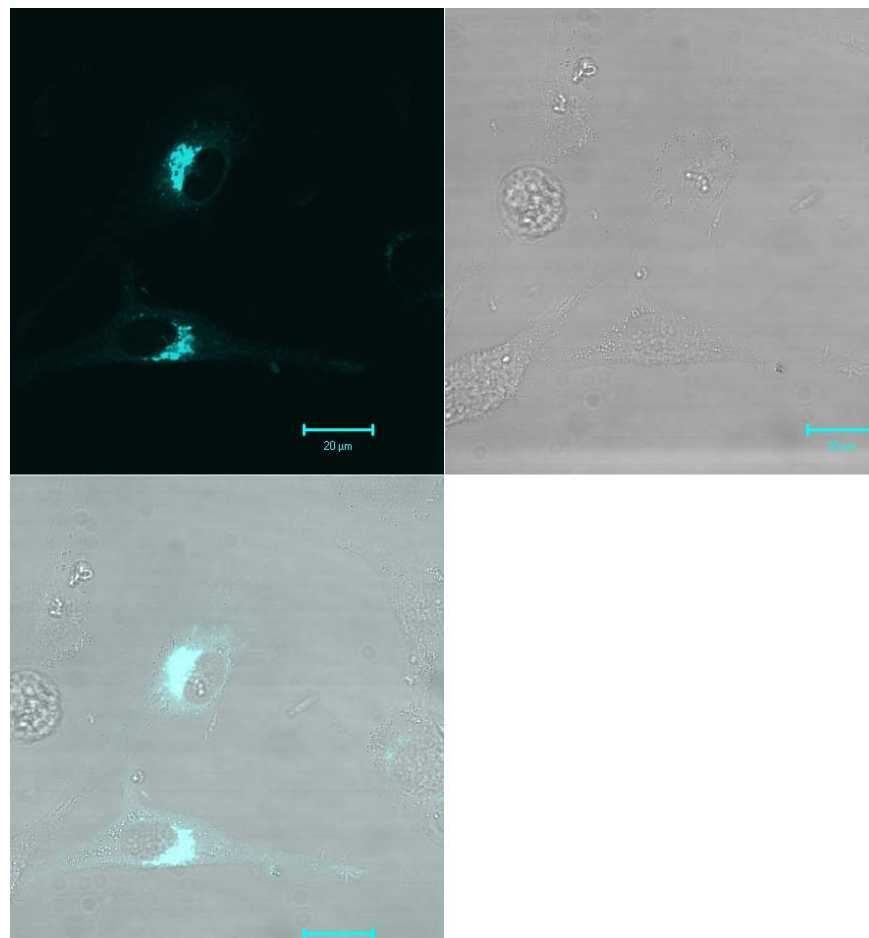


Abb. 3-16: Anfärben des trans- Golgi Bereiches in der As4.1- Zelle mit Hilfe des pECFP Vektors

Die Aufnahme der lebenden Zelle erfolgte nach 20h Inkubation, unter 10%CO₂ Begasung, bei 37°C, mit Hilfe des LSM 510 bei einer Anregungswellenlänge (Argonlaser) von 458nm; HFT 458nm; LP 475nm; 63X/1,4 Oil.

Da die As4.1 Zellen einem ständigen Teilungsdruck unterliegen war es vorstellbar, dass dadurch die Vesikelbildung derart beeinträchtigt ist, dass es zu den vorliegenden Anhäufungen des Renins in dem trans Golgi Netzwerk kommt. Ob dies durch ein sehr schnelles Ausschleusen der Vesikel bedingt ist, und damit ein Detektieren in der Momentaufnahme nicht möglich ist oder so wenig aktives Renin akkumuliert in den Vesikel der immortalisierten As4.1 Zelle auftritt, dass es schlicht unter der Detektionsgrenze liegt, konnte aufgrund der gezeigten Bilder nicht abschließend geklärt und muss unter verschiedenen Aspekten diskutiert werden.

Der zu behebende Defekt musste dementsprechend nicht in der Generierung des Konstruktes, sondern in den strukturellen Gegebenheiten der As4.1 Zelle selbst und dabei in der Ausbildung von Reninvesikeln allgemein gesucht werden.

Da auch die Transfektion der übrigen Konstrukte, wie nach den vorhergehenden Ergebnissen erwartet, keine entsprechende Reninvesikelbildung erkennen ließ wurden die Ergebnisse nicht in der vorliegenden Arbeit aufgeführt.

2.2 Förderung der Reninvesikelbildung in As4.1 Zellen

Die Expression von Cyclinen, die im Zusammenspiel mit den Cyclin- abhängigen- Kinasen (CDK) an der Zellzyklusregulation beteiligt sind, hängt bekanntermaßen vom jeweiligen Zellzyklus Stadium ab. (Arellano und Moreno, 1997). Daher ist es möglich die Expressionsrate der Cycline als Marker für Zellstadien heranzuziehen.

Cyclin- aktivierte Proteinkinasen spielen in der Regulation des Zellzyklus eine entscheidende Rolle. Erst durch die Komplexierung der CDKs mit spezifischen Cycline und der Bindung von ATP kommt es zu einer Aktivierung der Kinasen. Die daraus resultierende Phosphorylierung entsprechender Zielproteine führt dann zu einem Überschreiten der Übergänge zu den einzelnen Phasen des Zellzyklus. (Meijer L. et al., 1997)

Es wurde daher im Folgenden, durch den Einsatz spezifischer pharmakologischer Inhibitoren des Zellzyklus, versucht die Teilungsaktivität der Zellen herabzusetzen, um so eine darstellbare Reninvesikelbildung voranzutreiben. Der Nachweis über den Erfolg des Manövers sollte zum einen durch Bestimmen der Wachstumsrate als auch auf molekularer Ebene erfolgen.

2.2.1 Zellzyklusinhibitoren: Roscovitin und Olomoucine

Spezifische pharmakologische Inhibitoren, wie Olomoucine oder Roscovitine, hemmen die Cyclin- Kinasen- Komplexe reversibel indem die ATP-Bindestellen kompetitiv blockiert werden. Da beiden Manöver laut Literatur einen Arrest in der G1 – Phase zur Folge haben können, fiel die Wahl als Zellzyklusmarker auf CyclinA2, dessen mRNA Abundanz in Folge der Arretierung in der G1-Phase- abfällt.

Die notwendigen Konzentrationen der pharmakologischen Substanzen wurden in Vorversuchen experimentell ermittelt und lagen in den aus der Literatur bekannten Bereichen. Die beste Hemmung des Zellwachstums wurden dabei mit einer Endkonzentration von Olomoucine von 100µM und Roscovitine von 10µM in 5% FCS DMEM erreicht.

Eine Expressionsanalyse der CyclinA2 mRNA Abundanz bestätigte diese Ergebnisse. (Abb. 3-17). So wurde durch den Einsatz von 100µM Olomoucine die Expression von CyclinA2 mRNA um 75% gegenüber der Kontrolle gesenkt, während 10µM Roscovitin lediglich eine tendenzielle Verringerung der CyclinA2 mRNA Expression um 30% verursachte.

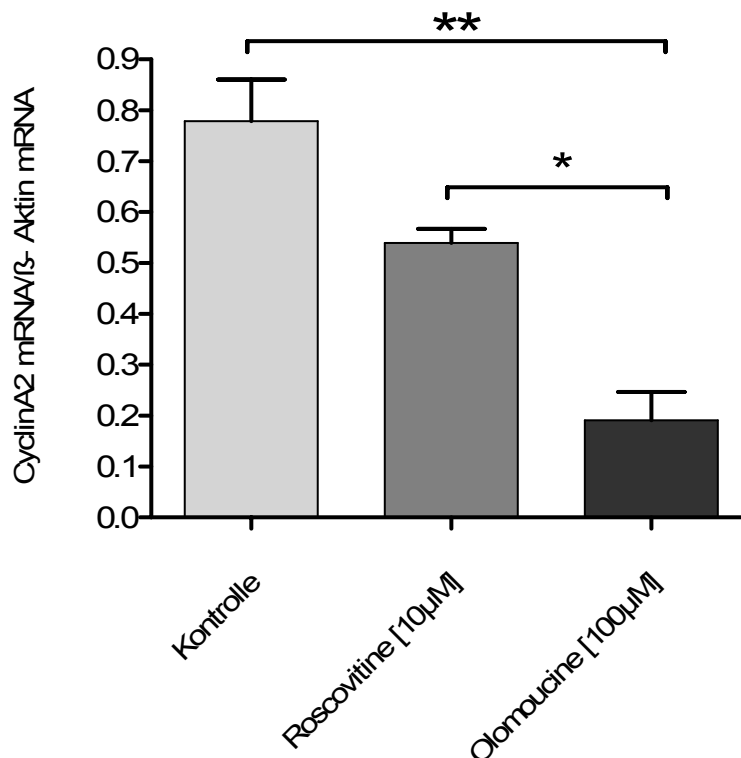


Abb. 3-17: Einfluss von Olomoucine (100µM) bzw. Roscovitine (10µM) auf die CyclinA22 mRNA Expression.

Die Zellen wurden 48h mit den entsprechend konzentrierten Wirksubstanzen inkubiert. Die Abundanz wurde mittels Realtime PCR quantifiziert und auf die β-Aktin mRNA bezogen. Die Werte sind Mittelwerte \pm SEM aus jeweils 3 Messungen. Die Sterne kennzeichnen Unterschiede mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ bzw. $p < 0,001$ gegenüber der Kontrolle.

Daher wurden alle weiteren Versuche nur noch mit Olomoucine als Wirksubstanz durchgeführt.

2.2.2 Auswirkung von Olomoucine auf die Reningenexpression

Da der Einsatz von Olomoucine bei den kultivierten As4.1 Zellen zu einer gewünschten Verlangsamung bzw. einem Zellwachstumsarrest führte war nun von großem Interesse welche Auswirkungen dieses Phänomen auf die Reningenexpression haben würde. Daher wurde diese, wie oben bereits beschrieben, unter dem Einfluss von Olomoucine charakterisiert.

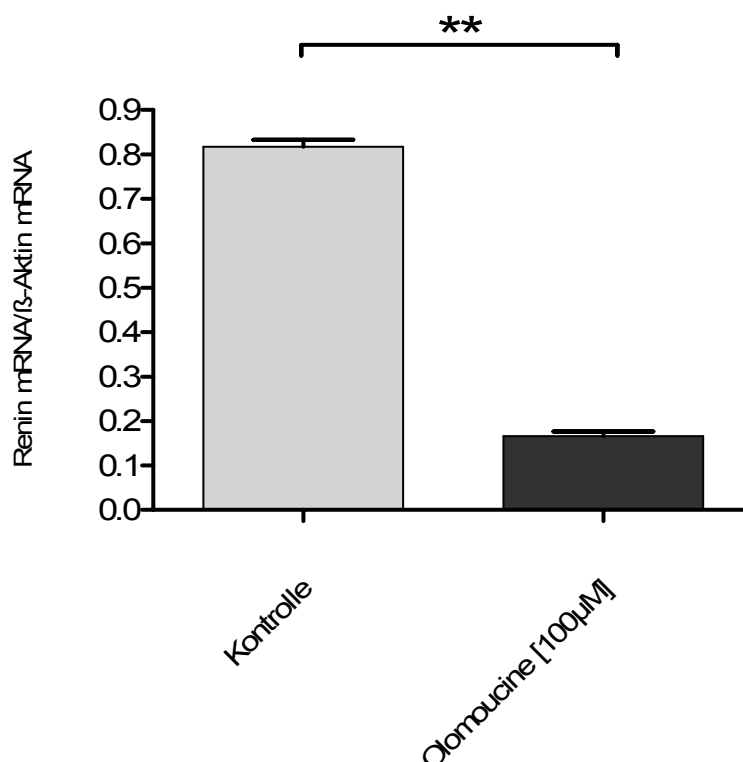


Abb. 3-18: Expression der Renin mRNA in Olomoucine behandelten As4.1-Zellen.

Die Zellen wurden 48h mit Olomoucine [100μM] inkubiert und anschließend nach Standardprotokoll die mRNA isoliert und quantifiziert. Die Werte sind Mittelwerte \pm SEM aus jeweils 3 Messungen. Die Sterne kennzeichnen Unterschiede mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,01$ gegenüber der Kontrolle.

Es zeigte sich (Abbildung 3-18), dass die Renin mRNA Konzentration durch die Inkubation der Zellen mit Olomoucine um den Faktor 4,9 gegenüber der Kontrolle verringert wurde.

In weiteren parallel durchgeführten Versuchsansätzen wurden die Auswirkungen verschiedener Manöver auf die Reningenexpression in Olomoucine behandelten und unbehandelten Kontroll- Zellen untersucht.

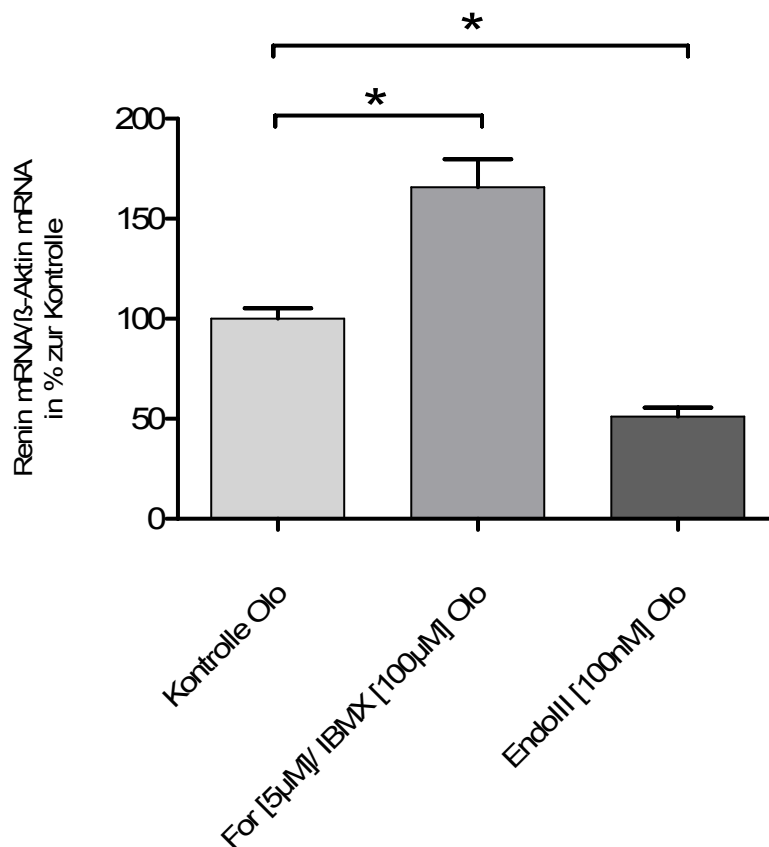


Abb. 3-19: Reningenexpression Olomoucine behandelter As4.1- Zellen
Die Zellen wurden 48h mit Olomoucine [100μM] inkubiert und für weitere 18h zusätzlich mit den jeweiligen Testsubstanzen inkubiert. Anschließend wurde nach Standardprotokoll die mRNA isoliert und quantifiziert. Die Werte sind Mittelwerte \pm SEM aus jeweils 3 Messungen. Die Sterne kennzeichnen Unterschiede mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,01$ gegenüber der Kontrolle.

Es konnte gezeigt werden, dass durch das klassische Stimulationsmanöver mittels Forskolin/IBMX (Initiierung des cAMP- Signalweges) die Reningenexpression um den Faktor 1,6 in den Olomoucine behandelten Zellen gesteigert werden konnte.

Eine Verminderung der Renin mRNA Abundanz konnte durch Endothelin III (Erhöhung des intrazellulären Kalziumspiegels) um den Faktor 1,9 erreicht werden. (Abb. 3-19)

Dies passt gut mit den erhobenen Daten der unbehandelten As4.1- Zellen überein.

In den Kontrollzellen konnte durch die Stimulation mit Forskolin/IBMX ein Anstieg der Renin mRNA Abundanz um den Faktor 1,9 gemessen werden. Die regulatorische Wirkung von Endothelin III auf die inkubierten Zellen zeigte sich durch eine Erniedrigung der Renin mRNA Konzentration um den Faktor 4,7 (Abb. 3-21b.) Diese Werte decken sich mit den bereits in der Literatur gezeigten Daten.

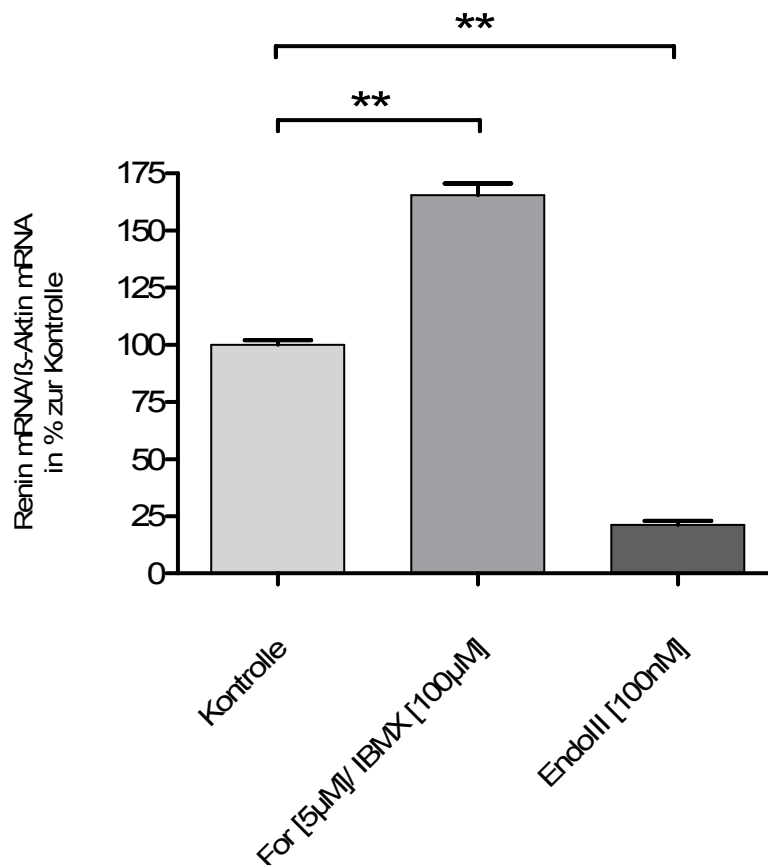


Abb. 3-20: Reningenexpression unbehandelter As4.1- Zellen

Die Zellen wurden 48h in Kontroll- Medium und für weitere 18h zusätzlich mit den jeweiligen Testsubstanzen inkubiert. Anschließend wurde nach Standardprotokoll die mRNA isoliert und quantifiziert. Die Werte sind Mittelwerte \pm SEM aus jeweils 3 Messungen. Die Sterne kennzeichnen Unterschiede mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,001$ gegenüber der Kontrolle.

Die Charakterisierung der Reningenexpression in Olomoucine behandelten Zellen zeigte, dass die Reningenexpression per se erniedrigt ist, aber die Regulation des Systems durch klassische Manöver möglich ist. Daher ist das Modell für weitere Untersuchungen, im Besonderen bezüglich der Reninvesikelbildung, geeignet.

2.2.3 Verhältnis von Renin/Prorenin in Olomoucine behandelten As4.1 Zellen

Es wurde im Folgenden überprüft wie sich die Behandlung der Zellen mit Olomoucine auf die Sekretionsrate des endogen aktivierten Renins auswirkt.

Es wurden 80 000 Zellen pro Well in einer 24er Wellplatte ausgesät, nach 24h wurde das Zellkulturmedium durch Medium mit 100µM Olomoucine ersetzt bzw. bei den Kontrollzellen ein einfacher Mediumwechsel durchgeführt. Nach weiteren 24h Inkubation wurde das Prozedere wiederholt. Am nächsten Tag wurde der Überstand der Zellen gesammelt und die Zellen nach Standardprotokoll lysiert. Die Proben ohne bzw. mit Aktivierung durch Trypsin vermessen. Die dafür notwendige Konzentration an Trypsin wurde in Vorversuchen experimentell ermittelt und auf 0,01 mg/ml für die Aktivierung des Lysats und auf 2mg/ml für die Aktivierung des Zellüberstandes festgelegt.

Die Quantifizierung des sezernierten Renins erfolgte dabei mittels eines Angiotensinl RIAs (Material und Methoden 2.8.1). Die Reninkonzentration von Zelllysats und Zellüberstand der Kontrollzellen und Olomoucine behandelten Zellen wurde für die Darstellung der Reninsekretion ins Verhältnis gestellt.

Wie die Abbildung 3-21 zeigt konnte durch den Einsatz von Olomoucine eine Erhöhung der Reninsekretionsrate um den Faktor 2 gegenüber den Kontrollzellen erreicht werden.

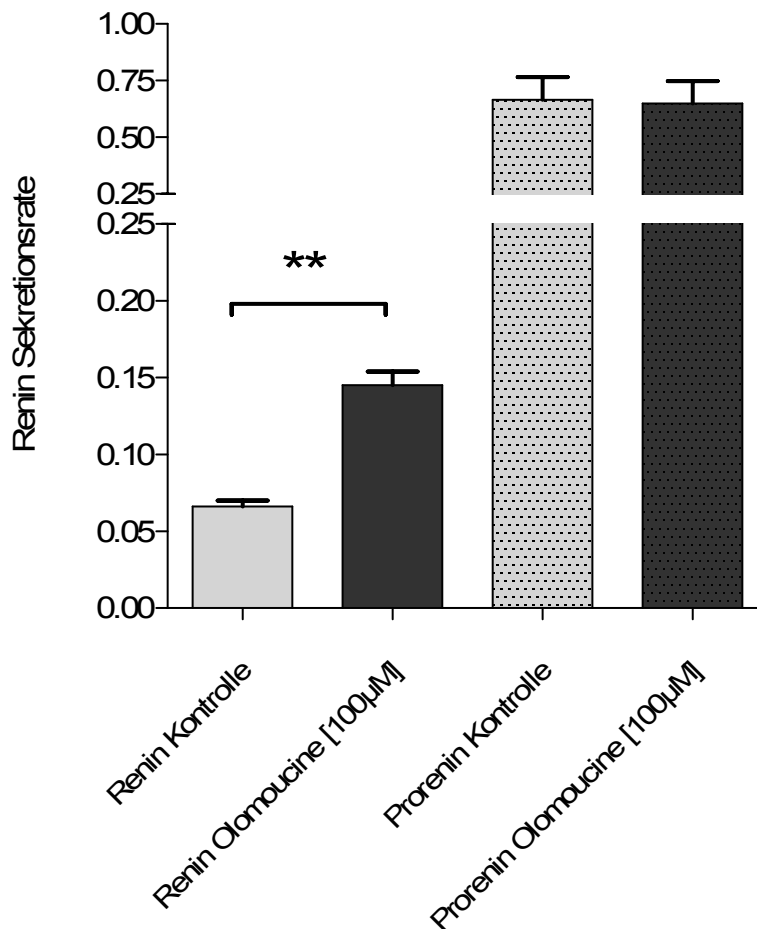


Abb. 3-21: Renin- und Prorenin- Sekretionsraten der Kontroll- bzw. Olomoucine- behandelten Zellen. Die Werte sind Mittelwerte \pm SEM aus jeweils 3 Messungen. Die Sterne kennzeichnen Unterschiede mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,01$ gegenüber der Kontrolle.

Da in vorhergehenden Versuchen gezeigt werden konnte, dass die Renin mRNA Abundanz unter Olomoucine gegenüber den Kontrollzellen um einen Faktor 5 erniedrigt wurde, war klar, dass dieses Phänomen nicht auf eine gesteigerte Renin mRNA Expression zurück geführt werden kann.

Durch die Quantifizierung der nicht aktivierten und aktivierten Proben im Angl RIA wird deutlich, dass eine Verschiebung des Renin/Prorenin Verhältnisses durch den Einsatz von Olomoucine erfolgt ist.

2.2.4 Auswirkung von Olomoucine auf die Reninvesikelbildung

Sowohl das Wachstumsverhalten der mit Olomoucine behandelten Zellen, als auch die erniedrigte CyclinA2 mRNA Abundanz und das veränderte Verhältnis von Prorenin zu Renin deuten auf einen gewünschten Arrest der Zellen hin. Da die Reifung sekretorischer Proteine sich meist optisch durch ein Verdichten der Vesikel bemerkbar macht wurde im Folgenden untersucht inwiefern sich dies bei den behandelten As4.1- Zellen nachweisen lässt.

Peti- Peterdi konnten 2004 (Peti-Peterdi et al., 2004) zeigen, dass Quinacrine, ein acidotropher Farbstoff, geeignet ist um, neben sauren Organellen auch Reninvesikel in der lebenden Zelle anzufärben. Diese Methode wurde herangezogen um relativ schnell einen ersten Eindruck von der Verteilung der Organellen bzw. der Reninvesikel, nach den jeweiligen Manövern zu bekommen.

Quinacrine ist ein so genannter Lebendfarbstoff, der durch freie Diffusion in die Zellen eindringen kann und daraufhin in sauren Organellen akkumuliert. Durch den niedrigen pH, wie er auch in typischen Reninvesikeln vorliegt, kommt es zu einer Konformationsänderung des Fluorophors was zur Folge hat, dass bei einer Anregungswellenlänge von $\lambda=458\text{nm}$ ein Fluoreszenzsignal emittiert wird.

Es wurden Zellen ausgesät, über Nacht in 5%FCS DMEM bei 37°C und 10%CO₂ inkubiert. Anschließend wurde ein Teil der Ansätze weiterhin mit Kontroll-Medium (5%FCS DMEM) inkubiert, während der andere Teil mit 5%FCS Medium und dabei mit einer Endkonzentration von 100µM Olomoucine für weitere 48h inkubiert.

Nach Zugabe von Quinacrine [1µM] wurden die Zellen eine weitere Stunde inkubiert und anschließend mittels konfokaler Mikroskopie untersucht (Material und Methoden 2.10.1).

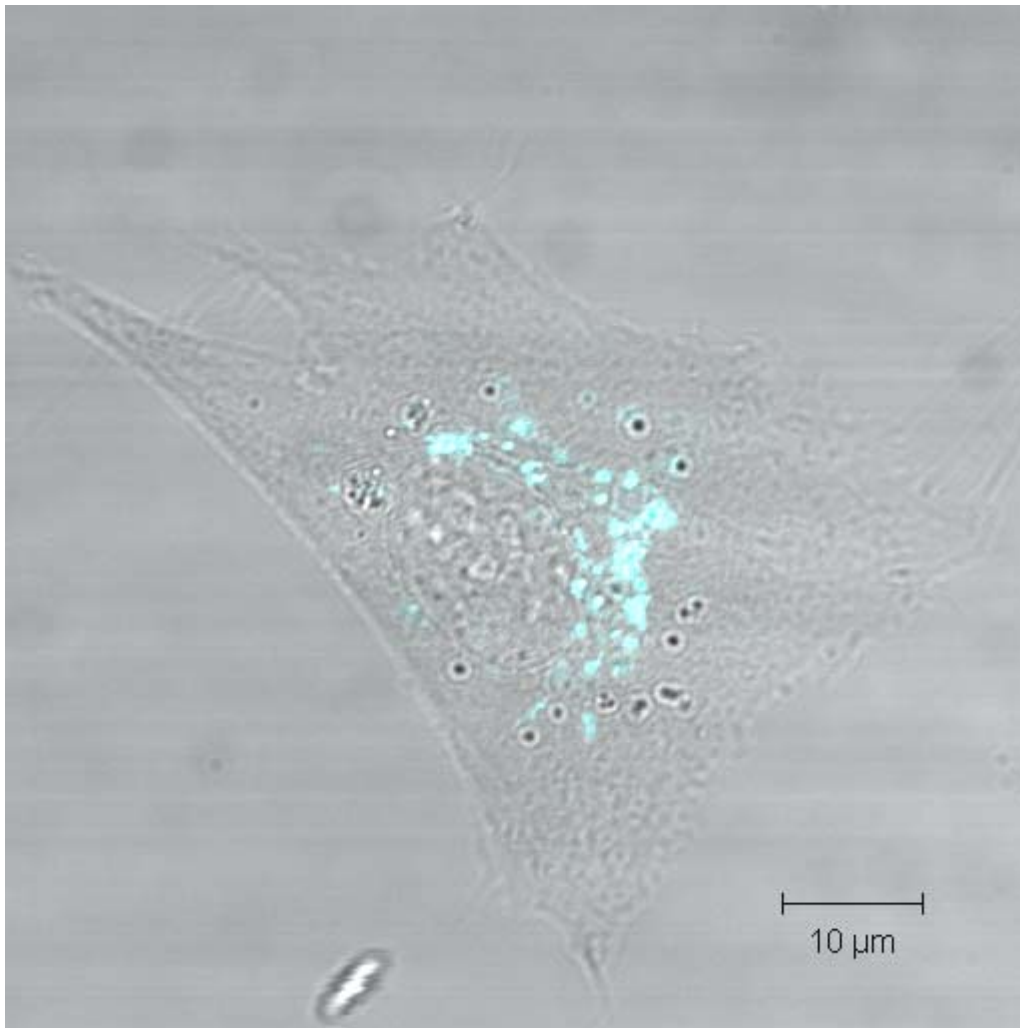


Abb. 3-22: Lebendfärbung unbehandelter As4.1- Zellen mittels Quinacrine
Die Aufnahme erfolgte am LSM 510, bei Durchlicht und einer Anregungswellenlänge $\lambda = 458\text{nm}$ HFT 458nm; LP 475 Filters; 63X/1,4Oil

Es ließen sich deutliche Unterschiede in der Reninvesikelverteilung erkennen. Während die Kontrollzellen (Abb. 3-22) das bereits bekannte Verteilungsmuster aufzeigten, die typische Anhäufung gefärbter Granulen im perinukleären Bereich der Zelle, zeigten die mit Olomoucine behandelten Zellen (Abb. 3-23) ein abweichendes Muster in der Verteilung der gefärbten Granulen auf. Wie man gut erkennen kann sind die Vesikel nicht mehr direkt im Bereich des Zellkerns lokalisiert sondern verteilt im Zytoplasma der Zelle zu finden.

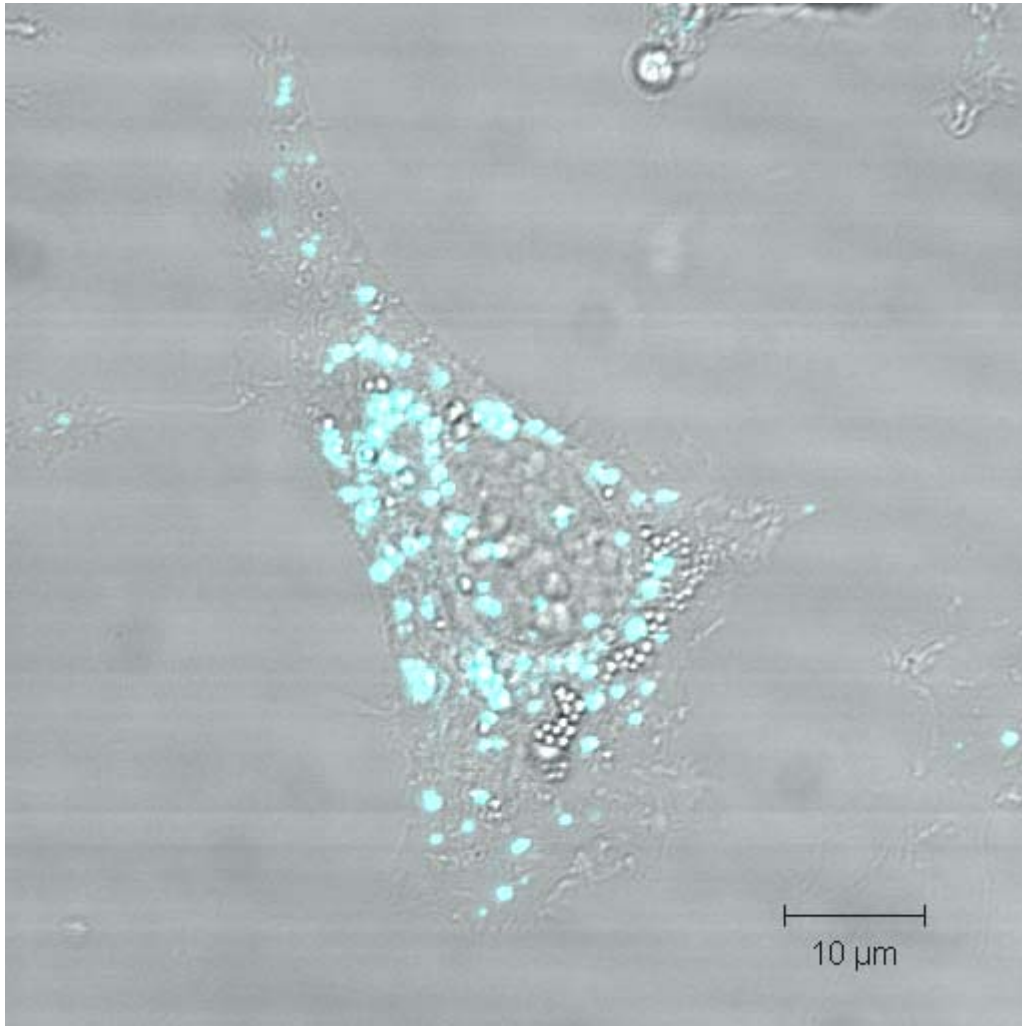


Abb. 3-23: Lebendfärbung Olomoucine behandelter As4.1- Zellen mittels Quinacrine

Die Aufnahme erfolgte am LSM 510, bei Durchlicht und einer Anregungswellenlänge $\lambda = 458\text{nm}$ HFT 458nm; LP 475 Filters; 63X/1,4Oil

Die Befunde konnten mittels spezifischer Renin- HRP Färbung Methanol fixierter As4.1- Zellen bestätigt werden. Die Zellen wurden jeweils wieder wie oben beschrieben behandelt, Methanol fixiert und gefärbt (Material und Methoden 2.10.2).

Die Abbildungen 3-24 und 3-25 zeigen im direkten Vergleich deutlich, dass sich die Reninvesikelverteilung in Olomoucine behandelten Zellen verändert hat. Die Kontrollzellen zeigen eine spezifische Färbung im Bereich des Zellkerns, was gut zu den Ergebnissen der Quinacrine Färbungen in lebenden Zellen passt. Während die mit Olomoucine inkubierten Zellen bei der anschließenden Renin- HRP- Färbung diese Anhäufung nicht mehr aufweisen. Vielmehr konnten hier distinkte Vesikel im Zytoplasma der Zelle nachgewiesen werden, was wiederum ganz eindeutig die vorhergehenden Ergebnisse der Quinacrine Färbungen untermauern.

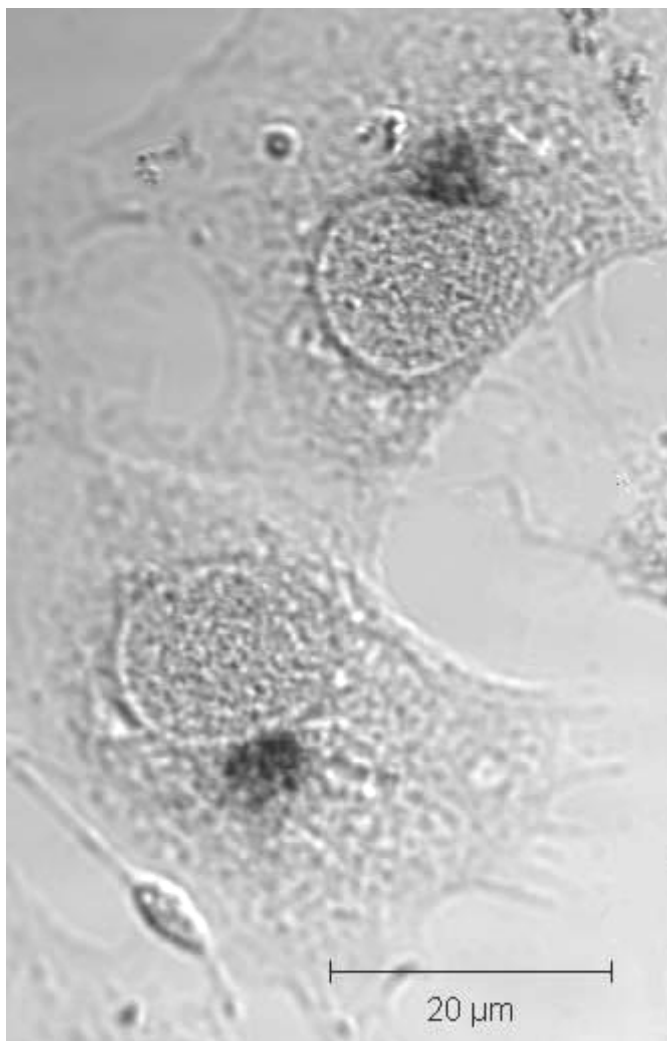


Abb. 3-24: Renin- HRP Färbung unbehandelter As4.1- Zellen
Die Aufnahme erfolgte am LSM510 Durchlicht 63X/1,4Oil

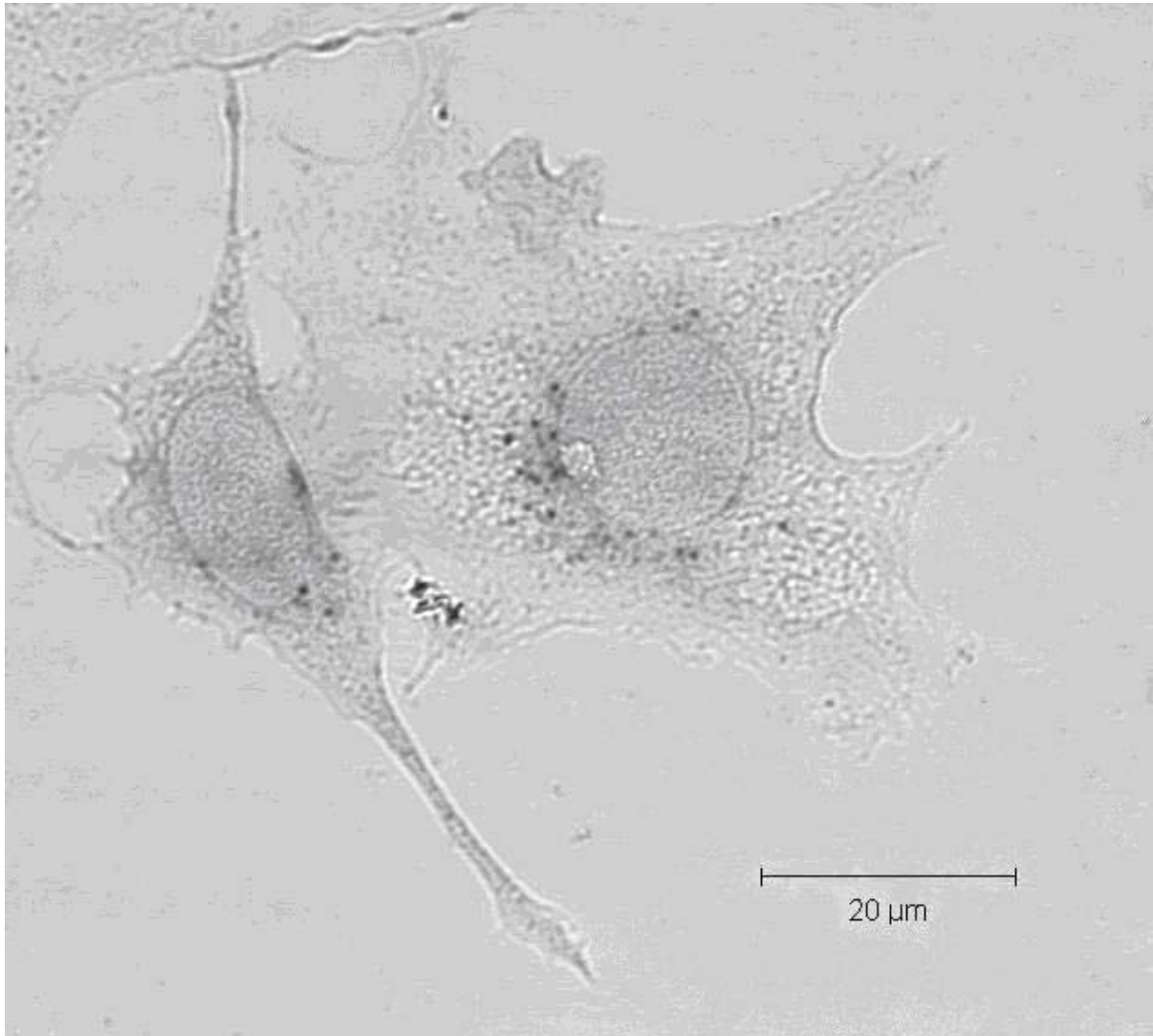


Abb. 3-25: Renin- HRP Färbung Olomoucine behandelter As4.1- Zellen
As4.1 Zellen wurden nach 48h Inkubation mit 100µM Olomoucine nach Standardprotokoll Methanol fixiert und anschließend mit spezifischen Anti-Renin- Antikörpern inkubiert. Die Aufnahme erfolgte am LSM510 Durchlicht; 63X/1,4Oil

2.2.5 Auswirkungen von Olomoucine auf die Reninvesikelbildung in transfizierten Zellen

Durch die Etablierung des in- vitro Systems sollte unter anderem gewährleistet werden, dass ein optischer Nachweis und gegebenenfalls auch ein live- time imaging der Reninvesikel mit Hilfe der dafür generierten Konstrukten möglich ist. Nachdem gezeigt werden konnte, dass die Zellarretierung sich positiv auf die Bildung von Reningranulen und damit verbunden auch auf die endogene Aktivierung des Renins auswirkt, sollte nun im nächsten Schritt überprüft werden, ob auch in transfizierten Zellen durch Olomoucine eine Reninvesikelbildung begünstigt werden und damit auch eine verbesserte Darstellung der Reningranulen in transfizierten As4.1 Zellen erreicht werden kann.

Die As4.1 Zellen wurden wie in Material und Methoden 2.2.2 beschrieben transfiziert und nach 18h Inkubation mit dem Transfektionsreagenz und Vektor für weitere 48h mit Olomoucine [100µM] haltigem Medium inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für die konfokale Mikroskopie entsprechend vorbereitet.

In Abbildung 3-26 zeigt sich eine distinkte Reninvesikelbildung in den transfizierten Zellen. Wie im Vergleich zu Abb. 3-16 nochmals ganz deutlich zu erkennen ist, hat hier die Olomoucine Behandlung der Zellen dazu geführt, dass die Reningranulenbildung gefördert wird und damit die Darstellung der fluoreszierenden Fusionsproteine ermöglicht.

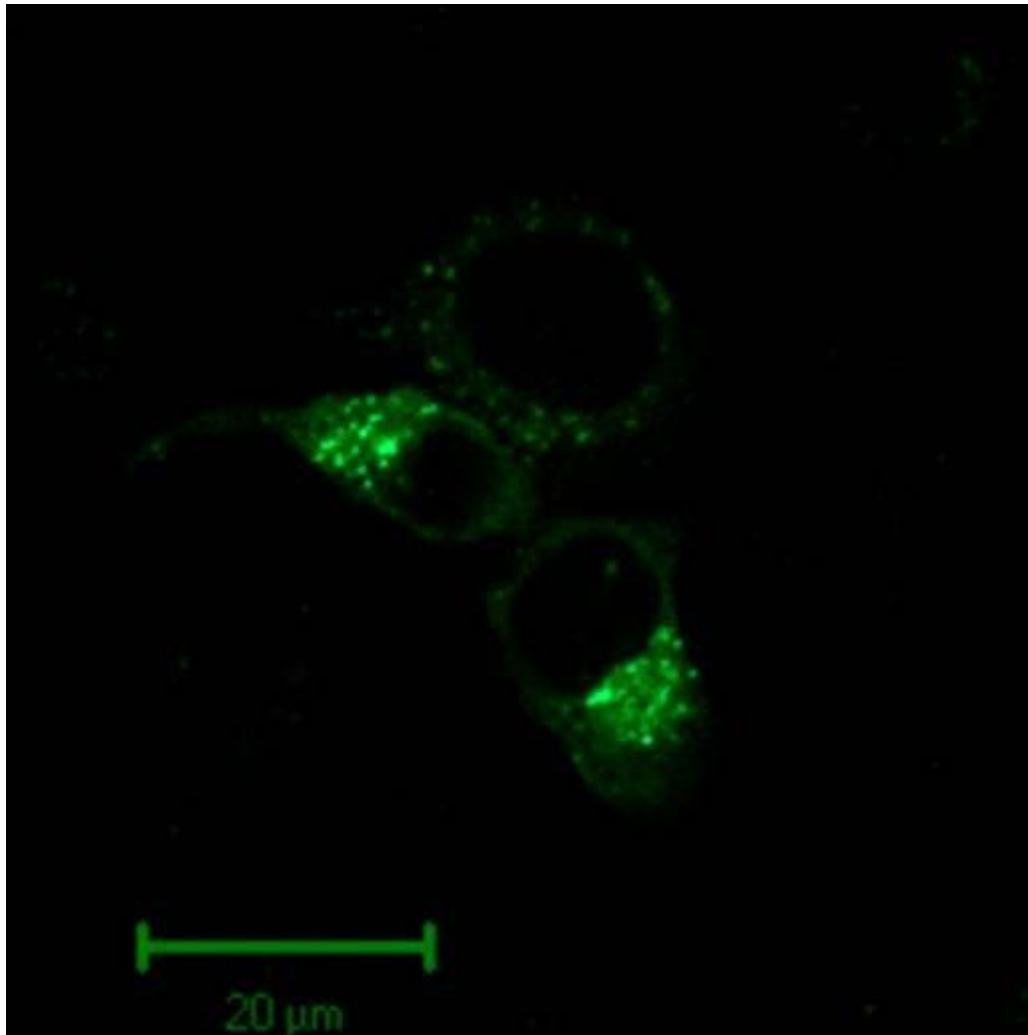


Abb. 3-26: As4.1 Zellen transfiziert mit pRen1EGFP und anschließender Olomoucine Behandlung.

Die Aufnahme der lebenden Zelle erfolgte nach 48h Inkubation mit Olomoucine [100μM], unter 10%CO₂ Begasung, bei 37°C mit Hilfe des LSM 510 bei einer Anregungswellenlänge (Argonlaser) von 488nm, 63X/1,4 Oil.

IV Diskussion

1 Charakterisierung des murinen in- vivo Modells

Das Hauptziel war es die Bedeutung der Glykosylierung für die Prozessierung des Renins anhand eines murinen in- vivo Modells näher zu charakterisieren. Die in der Literatur gezeigten Ergebnisse konzentrierten sich bislang auf das jeweilige Ausknocken einer der Reninisoformen und die anschließende Charakterisierung der Tiere. Die Besonderheit der in dieser Arbeit durchgeführten Versuche lag darin, dass ein System generiert und untersucht wurde, mit dessen Hilfe in identischen Versuchsansätzen glykosyliertes und unglykosyliertes Renin parallel untersucht werden konnte.

Die in dieser Arbeit erhobenen Daten aus der F2 Generation der verpaarten homozygoten REN2- und C57/BL6- Mäusen (homozygote REN1- Tiere) zeigten im Bezug auf Körpergewicht, Körpergröße, oder Nierenentwicklung übereinstimmend mit den Befunden von Pentz et al. (2001), keinerlei Auffälligkeiten. Alle Mäuse besaßen durch die Generierung des neuen in- vivo Modells einen gemeinsamen genetischen Hintergrund. Durch die Tatsache, dass innerhalb der Nachkommen keine phänotypischen Unterschiede auftraten, konnte unter anderem auch belegt werden, dass das Renin2 Protein für die reine Aufrechterhaltung des zirkulierenden Renin- Angiotensin- Aldosteron- Systems ausreicht. Dieser Befund wird zusätzlich durch die Arbeit von Clark et al. (1997) gestützt. Sie konnten ebenfalls zeigen, dass eine genetische Inaktivierung des Renin1 Proteins in heterozygoten Mäusen, und damit eine ausschließliche Expression des REN2 Gens, ausreichend für ein Überleben der Tiere war.

Jedoch war der Plasmapreninspiegel der REN2 Tiere bereits unter basalen Bedingungen gegenüber den REN1 und den heterozygoten REN1/REN2 Tieren signifikant erniedrigt (Abb.3-1), was auch die Gruppe um Ellen Pentz (Pentz et al., 2001) in ihrem in- vivo Modell finden konnte. Im Gegensatz dazu hatte das Ausknocken des Renin1 bei REN1/REN2 (129SvJ) - Versuchstieren in den in- vivo

Versuchen von Clark et al. (1997) keine Unterschiede in der Plasmanreninkonzentration (PRC) zur Folge. Die Ursache für diese abweichenden Ergebnisse, lassen sich aber durch den experimentellen Versuchansatz erklären, da hier Mäuse mit unterschiedlichem genetischem Hintergrund verwendet wurden. Es ist seit längerem bekannt, dass der genetische Hintergrund der Versuchstiere eine sehr wichtige Rolle spielt (Lathe, 1996) und ein Datenvergleich zwischen zwei Mäusestämmen stets unter Vorbehalt gezogen werden muss. Der direkte Vergleich der Plasmanreninkonzentration zwischen 129SvJ und C57/BL6 Tieren (deren genetischer Hintergrund beiderseits in dem hier verwendeten in- vivo Modell zum Tragen kommt) zeigte unter normotensiven Bedingungen signifikante Unterschiede, ohne einen pathophysiologischen Effekt auf einen der Mäusestämmen zu haben. So konnte bei den männlichen 129SvJ Mäusen eine PRC von 178 [ng AngI/h*ml] ermittelt werden, während die C57/BL6 Mäuse eine PRC von 426 [ng AngI/h*ml] aufwiesen (Hansen et al., 2004). Diese Tatsache lässt den Schluss zu, dass die Ursache des Unterschieds der PRC zwischen den verschiedenen Ren1 Knockout Tieren im genetischen Hintergrund der Tiere zu finden ist und daher nicht im Widerspruch zu den hier erhobenen Daten steht. Vielmehr müssen sie lediglich im entsprechenden Kontext diskutiert werden.

Trotz der in dieser Arbeit gefundenen erniedrigten aktiven Plasmanreninkonzentration der REN2-Tiere wurde in diesen Tieren gleichzeitig im Vergleich zu den REN1 und den REN1/ REN2- Tieren eine um den Faktor 3 erhöhte Expression der Renin mRNA gemessen (Abb.3-2). Diese Befunde bestätigen andere Arbeiten, wie der von Clark und Kollegen, die eine Erhöhung der Renin mRNA Abundanz um den Faktor 2,8- 3,9 in Ren1 Knockout 129SvJ Mäusen postulierten (Clark et al., 1997; Villard et al., 1994). Bei weiteren Untersuchungen konnte außerdem gezeigt werden, dass die Abundanz des Gesamtrenin in den REN1- Mäusen der Renin mRNA Konzentration in REN1/REN2- Tieren entsprach (Abb.3-2). Diese Beobachtung machten auch Hansen und Kollegen bei vergleichenden Untersuchungen der Renin mRNA Expression von C57/BL6 und 129SvJ Tieren (Hansen et al., 2004). Bei der Differenzierung der renalen Gesamt- Renin mRNA Expression der heterozygoten REN1/REN2- Mäuse in Renin1 und Renin2 Abundanz konnte eine Expression von

2/3 Renin1 und 1/3 Renin2 mRNA gemessen werden, was durch die Befunde von Kim und Kollegen (Kim et al., 1999) bestätigt wurde (Abb.3-3).

Die Interpretation der obigen Daten legte die Vermutung nahe, dass die fehlende Glykosylierung der Renin2 Proteine zu einer zumindest stark verminderten oder gar ganz ausbleibenden endogen Aktivierung in den juxtaglomerulären Zellen führt. Damit ließe sich die erniedrigte aktive Plasmapreninkonzentration der REN2 Mäuse erklären. Dies wiederum würde in bekannter Weise zu einer erniedrigten Angiotensin II Konzentration im Blut führen, da das Renin- Angiotensin- System durch einen negativen Feedback- Mechanismus reguliert ist (Hackenthal et al., 1990). Die Folge dieser Rückkopplung resultiert in einer gesteigerten renalen Reningentranskription, was die gefundene erhöhte Transkription des Reningens in den in den REN2- Tieren gut erklärt. Bei dieser Theorie drängt sich aber die Frage nach der Herkunft des messbaren aktiven Reninspiegels im Plasma der REN2- Mäuse auf. Hierfür sind theoretisch zwei mögliche Erklärungen denkbar. Zum einen, dass das in der Speicheldrüse gebildete Renin2 theoretisch auch als Reaktion auf den erniedrigten Angiotensin II Spiegel reguliert ins Plasma entlassen werden kann. Zum anderen könnte die Ursachen einfach in einem erhöhten renalen Ausschleusen von Prorenin und einer dadurch bedingten erhöhten Umsetzung im Plasma der Tiere durch noch unbekannte systemische Faktoren liegen.

Für die Verneinung der ersten Theorie gibt es in der Literatur ausreichend Hinweise, die zunächst zeigen, dass Renin2 aus der Speicheldrüse so gut wie keinen Effekt auf die Plasmapreninkonzentration hat (Bing and Poulsen, 1971). Des Weiteren konnten Bing und Poulsen bereits 1975 durch Adenektomie bzw. Nephrektomie und gleichzeitiger Gabe eines ACE- Antagonisten bei REN1/REN2- Mäusen zeigen, dass die Freisetzung von Renin2 aus der Speicheldrüse keinesfalls abhängig von der Angiotensin II Konzentration im Blut der Tiere ist, wie das bekanntermaßen für die Freisetzung von Renin1/2 aus der Niere der Fall ist (Bing and Poulsen, 1975). Neben weiteren eindeutigen Hinweisen konnte daher aus diesen Tatsachen gesichert geschlossen werden, dass Renin2 aus der Speicheldrüse keine Rolle für die Blutdruckregulation spielt (Bing et al., 1980). Da somit aktives Renin im Plasma der Tiere nur aus der Niere stammen kann, blieb die Hypothese, dass es durch ein erhöhtes Ausschleusen von Prorenin ins Plasma dort zu einer Aktivierung durch systemische Faktoren kommt.

Durch die chronische Stimulation des Renin- Angiotensin- Aldosteron- Systems mit einer Kombination aus salzarmer Diät und der Hemmung des Angiotensin Converting Enzyms (ACE) durch Ramipril konnte gezeigt werden, dass dies zu einer gesteigerten aktiven Plasmanreninkonzentration (Abb.3-4) sowohl bei REN1-, REN1/REN2- als auch bei REN2- Mäusen führt. Dies lässt sich auf eine weitere regulierte Steigerung der Transkription zurückführen und könnte dann durch eine basal gesteigerte konstitutive Freisetzung des Renins bedingt sein. Sowohl bei den ausschließlich Renin2 mRNA exprimierenden REN2- Tieren als auch bei den REN1/REN2- Mäusen konnte unter diesen Bedingungen eine erhöhte Renin mRNA Abundanz (Abb.3-5a/3-5b) gezeigt werden. Dies konnten andere Arbeitsgruppen durch den Einsatz eines weiteren gebräuchlichen ACE- Hemmers, Captopril, (Mullins et al., 2000) oder durch Losartan, einem kompetitiven AT1- Rezeptor Antagonisten, bestätigen (Pentz et al., 2001).

Die Theorie der gesteigerten konstitutiven Sekretion des Prorenins wird durch Toffelmire und Kollegen (Toffelmire et al., 1989) untermauert, bei deren chronischer Stimulation des RAAS zu einer gesteigerten renalen Freisetzung von humanem Renin und Prorenin führt. Das bedeutet, dass neben einer gesteigerten Transkription der Renin mRNA (Mullins et al., 2000) sowohl die regulierte als auch die konstitutive Sekretion verstärkt in Kraft tritt. Durch Zellkultur- Modelle konnte gezeigt werden, dass murines renales Renin2 ebenfalls wie murines Prorenin 1 auf konstitutivem Weg die JG- Zelle verlässt (Chu et al., 1990; Fritz et al., 1987; Pratt et al., 1988a; Pratt et al., 1988b).

Es wird daher postuliert, dass hier, in dem vorliegenden in vivo Modell, neben einer nachweislich gesteigerten Transkription auch die konstitutive Sekretion durch diese Manöver gesteigert werden kann. Das bedeutet, dass in dem hier verwendeten in-vivo Modell das Fehlen des glykosylierten Renin1 Proteins in den REN2- Tieren zunächst durch eine bereits basal gesteigerte Renin2 mRNA Transkription kompensiert wird, was auch Clark et al. (1997) aufgrund ihrer Versuche vermuteten. Dadurch wird auch vermehrt inaktives Prorenin2 aus den Zellen geschleust was letztendlich zu einem erhöhten Plasmanreninspiegel führt (Villard et al., 1994). Diese Fakten lassen den Schluss zu, dass durch die Stimulation des RAAS auch das konstitutive Ausschleusen von inaktivem Prorenin2 in dem hier verwendeten in- vivo Model erhöht wird. Es wäre also durchaus möglich, dass keine endogene Aktivierung

des unglykosylierten Renin2 stattfindet und die messbare Erhöhung der Reninaktivität im Plasma der Tiere lediglich eine Folge des Auswirkens systemischer Faktoren auf den erhöhten Prorenin2- Spiegel im Plasma der Tiere ist. Dieser Kompensationsmechanismus würde die in dieser Arbeit gefundene gesteigerte aktive Reninplasmakonzentration erklären (Abb. 3-4).

Um abzuklären inwiefern die Sekretion von aktiven Renin nach Stimulation des RAAS in den REN2 Tiere im Vergleich zu REN1 und REN1/REN2- Mäusen sich unterscheidet wurde die Zeit der Stimulation verkürzt (Abb.3-6). Dabei konnte festgestellt werden, dass ebenfalls eine tendenzielle Erhöhung der aktiven Plasmapreninkonzentration erreicht werden konnte. Allerdings finden sich hier bereits deutliche Unterschiede in der Höhe der Stimulationseffekte zwischen den untersuchten Tieren. Bedingt durch die gewählte Zeitspanne des Versuches konnte hier, gegenüber den chronischen Stimulationsversuchen, die transkriptionelle Erhöhung der Renin2 mRNA Abundanz in den REN2- Tieren gesichert ausgeschlossen werden, da erst nach 3-4 Stunden eine Erhöhung der Renin mRNA Transkription durch Stimulation erreicht werden kann (Klar et al., 2002).

Aus diesem Grund kann davon ausgegangen werden, dass in den REN2- Mäusen lediglich die renale konstitutive Sekretionsrate des Prorenins durch das Manöver erhöht werden konnte, wie auch andere Arbeitsgruppen für humanes Renin zeigen konnten (Toffelmire et al., 1989). Somit kann hier im Gegensatz zur oben geschilderten chronischen Stimulation ein Einfluss der gesteigerten Renin mRNA Abundanz auf die erhöhte Plasmapreninkonzentration ausgeschlossen werden. Was die wesentlich erniedrigte aktive Plasmapreninkonzentration nach dem akuten Manöver gegenüber dem chronischen Manöver gut erklärt. Die signifikante Erhöhung der Plasmapreninkonzentration durch regulierte Sekretion in den REN1- und REN1/REN2- Tieren wurde durch Befunde von Schweda und Kurtz (2004) bestätigt

Die Versuchsergebnisse aus dem in vivo Modell der vorliegenden Arbeit zeigen, dass das unglykosylierte Renin2- Protein in der Lage ist das glykosylierte Renin1- Protein unter normotensiven Bedingungen zu ersetzen und auch unter chronischen Stimulationsmanövern das Renin- Angiotensin- Aldosteron- System durch eine Erhöhung der Renin2 mRNA Abundanz und einer gesteigerten Freisetzung von

Prorenin² aufrechterhalten zu können. Es zeigt sich unter akuten Stimulationsmanövern des RAAS, dass das Fehlen des glykosylierten Renin¹ Proteins nicht mehr vollständig kompensiert werden kann und folglich akut weniger aktives Renin in dem systemischen Kreislauf nachzuweisen ist.

Die Hypothese, dass die aktive Plasmapreninkonzentration unter allen aufgezeigten Bedingungen nicht durch in der JG- Zelle aktiviertes Renin²- Protein erfolgt, sondern die Aktivierung des Renins z.B. enzymatisch durch systemische Faktoren im Plasma stattfindet, wird dadurch weiter manifestiert. Der experimentelle Nachweis dieser Theorie kann aber in vivo nur schwerlich gezeigt werden, da eine weitere Verkürzung der Stimulationszeit zu einem Absinken der messbaren Veränderungen des aktiven Reninspiegels unter die Detektionsgrenze führen würde.

Zur Beantwortung dieser Fragestellung musste daher auf das ex- vivo Modell der isoliert perfundierten Niere herangezogen werden. Und dabei unter den klassischen Manövern der Stimulation des RAAS weitere Untersuchungen stattfinden. Das vom Körper der Versuchstiere isolierte System ermöglicht so eine Untersuchung der renalen Reninfreisetzung ohne Berücksichtigung des Einflusses von systemischen Faktoren. Die Befunde zeigten für die Perfusion der Nieren der REN1- und REN1/REN2- Mäuse während eines cAMP Manövers eine typische Erhöhung der Plasmapreninkonzentration, die auf eine regulierte Freisetzung endogen aktivierten Renins schließen lässt, wie es bereits von Schweda Kollegen in vorausgehenden Arbeiten reproduzierbar gezeigt werden konnte (Schweda et. al 2004). Während durch die Stimulation mit Isoproterenol in der isoliert perfundierten Niere der REN2- Mäuse keine Erhöhung der Reninaktivität gegenüber der basalen Ausgangssituation im Perfusat gemessen werden konnte (Abb.3-7). Dadurch konnte gezeigt werden, dass das unglykosylierte Renin² nicht aktiv aus der Niere freigesetzt wird. Die geringfügig basal vorhandene Reninkonzentration im Perfusat der REN2- Tiere kann auf die unspezifische Aktivierung durch das Einfrieren und Auftauen der Perfusatsproben zurück zu führen sein (Fyhrquist and Puutula, 1978). Oder durchaus auch auf den Einsatz des „Reninsubstrats“ für die Durchführung des AngI RIAs. Es handelt sich dabei um Serum bilateral nephrektomierter Ratten, das dialysiert wurde. Die Porengröße wurde dabei so gewählt, dass das Renin durch die Dialyse vollständig entfernt wurde. Aus unveröffentlichten Daten geht aber hervor, dass die

Chargen des Reninsubstrats leichte Unterschiede bezüglich verbleibender Reninkonzentration aufweisen können, was dementsprechend die messbare Reninkonzentration der REN2- Perfusatproben erklären würde.

Abschließend lässt sich festhalten, dass durch die Etablierung des in- vivo Modells eindeutig gezeigt werden konnte, dass das unglykosylierte Renin2 Protein für die Aufrechterhaltung des RAAS zwar ausreichend ist, aber das glykosylierte Renin1 Protein nicht vollständig ersetzen kann. Es konnte anhand der aktiven Plasmapreninkonzentration in Zusammenhang mit den Renin mRNA Daten belegt werden, dass hier lediglich ein Kompensationsmechanismus die fehlende Glykosylierung des Renin2 Proteins ausgleicht, der allerdings bei einer akuten Stimulation schon wesentlich schlechter greift als dies bei der chronischen Stimulation des RAAS in den REN2- Tieren der Fall ist. Es konnte weiterhin erstmals mittels der isoliert perfundierten Niere gezeigt werden, dass die Aktivierung des Renin2 Proteins nicht endogen stattfindet, sondern durch im Plasma vorhandene Faktoren herbeigeführt werden muss. Welche Faktoren dafür verantwortlich sind und welche physiologische Bedeutung dies haben könnte muss in weiteren Versuchen geklärt werden.

2 Etablierung eines in vitro Systems

Zur Untersuchung der Reninprozessierung auf zellulärer Ebene ist es unabdingbar ein in- vitro System zur Verfügung zu haben. Die Etablierung dieses Systems sollte dabei folgende generellen Anforderungen erfüllen: das leichte Handling der Zellkultur, die gesicherte Expression der transient transfizierter Vektoren und die Möglichkeit der Zelle sekretorische Proteine konstitutiv oder reguliert auszuschleusen. Viele Versuche bezüglich der Renin- Expression und - Prozessierung wurden bereits in verschiedensten in vitro Systemen untersucht. Beispielsweise konnte gezeigt werden, dass die Glykosylierung des renalen Renins die Transit- Time des Proteins beeinflusst, was für den Reifungsprozesse des Renins eine entscheidende Rolle spielt (Paul et al., 1988) oder die Glykosylierung unabdingbar für das Einschleusen in den Weg der regulierte Sekretion ist (Rothwell et al., 1993) um nur einige wenige zu nennen.

Das Ziel dieser Arbeit war es, ein in- vitro System auch zusätzlich für die optische Darstellung der Reninprozessierung zu etablieren, welches über die oben genannten Anforderung hinaus, endogen Renin exprimiert und dessen Zellursprung die murine Niere ist. Die Wahl der Zelllinie in der vorliegenden Arbeit fiel deshalb auf die immortalisierte JG- Zelllinie AS4.1 (Bader and Ganten, 2000; Jones et al., 1997; Sigmund et al., 1990), da diese die genannten Voraussetzungen für die Untersuchung der Reninprozessierung erfüllten. Faust und Kollegen (Faust et al., 1987) konnten im Zuge ihrer Experimente die Notwendigkeit dieser Voraussetzungen bestätigen, da die Expression humaner Renin cDNA in *Xenopus* Oocyten und in einer Säugetier- Zelllinie (L-2234) Unterschiede in ihren posttranslationalen Modifikationen aufwiesen. Die oben bereits erwähnten etablierten Systeme hatten alle ein großes Manko: die verwendete Zelllinie war nicht in der Lage endogen renales Renin zu exprimieren und entsprechenden zu regulieren oder waren gar ganz artfremd.

2.1 Konstrukte

Zur Sicherstellung, dass das System effizient genutzt werden kann wurde zunächst die Transfektionseffizienz (Abb.3-8) und die mittlere Fluoreszenzintensität (Abb.3-9) der Zellen nach transienter Transfektion der selbst generierten pReninXEGFP Konstrukte untersucht. Dazu wurde im Vorfeld experimentell das bestmögliche Verhältnis von Transfektionsreagenz und Vektor [μg] ermittelt. Die daraus gewonnene optimale Ratio wurde für alle weiteren Untersuchungen dann eingesetzt. Jacobsen et al. konnten mit ihren Befunden die Notwendigkeit dieser Vorarbeit bestätigen. Sie zeigten, dass die erreichte Transfektionseffizienz in die Zellen hauptsächlich von dem Zusammenspiel von Vektor- Reagenz abhängt (Jacobsen et al., 2004). Es konnte gezeigt werden, dass die Transfektionseffizienz der mutierten ReninEGFP- Fusionsplasmide sich nicht von der Effizienz des ursprünglichen EGFP Plasmids unterscheiden (Abb.3-8). Des Weiteren war es für optische Untersuchungen unerlässlich eine gleich bleibende mittlere Fluoreszenzintensität der Fusionsproteine in der Zelle zu gewährleisten. Die vergleichenden Analysen zeigten, dass das ursprüngliche Enhancend Green Fluorescent Protein bei einer Anregungswellenlänge von 488nm eine höhere Fluoreszenz als das RenEGFP Fusionsprotein und den entsprechend mutierten Fusionsproteinvarianten emittierte (Abb.3-9). Dies kann auf eine leichte Konformationsänderung von EGFP durch die Fusionierung mit Renin zurückgeführt werden. Was in der neueren Literatur bestätigt wird. Das Phänomen der erniedrigten Fluoreszenz bedingt durch Vektordesign und die daraus resultierende Konformationsänderung des EGFP im Fusionsprotein wird durch etliche Befunde auch aufgezeigt (Thomas, 2007). Bei der hier vorliegenden Einschränkung handelte es sich allerdings nur um eine minimale Reduktion in der Intensität der generierten Fusionsproteine, die zu dem noch hervorragend nachweisbar war und die keinerlei Unterschied unter den verschiedenen Fusionsproteinen selbst erkennen ließ. Daher wurde der zukünftige Einsatz der Konstrukte für Versuche als positiv eingestuft.

Eine weitere wichtige Voraussetzung für eine erfolgreiche Systemetablierung war die biochemische Nachweisbarkeit der Fusionsproteine in Zelllysate und Überstand der

transfizierten Zellen. Dies sollte gewährleisten, dass in parallelen Versuchsansätzen während der optischen Lokalisation auch gleich durch entsprechenden Aufreinigungsverfahren der biochemische Nachweis und erfolgen kann.

Der biochemische Nachweis der Fusionsproteine im Lysat der transfizierten As4.1-Zellen zeigte Bandenmuster, die je nach Fusionsprotein, Glykosylierungszustand und/oder Deletion der Prä- bzw. Prosequenz des Renins zwischen 65 und 75 kDa lagen (Abb.3-10). Dies entsprach der erwarteten Laufrhöhe der unterschiedlich glykosylierten Renin Proteine plus des 27kDa großen EGFPs. Dies deckt sich gut mit den Ergebnissen von Jones et al. (1996) und Laframboise et al. (1997), die durch radioaktive Markierung die verschiedenen Reninformen aufzeigten.

Der Nachweis der Renin Fusionsproteine im Überstand konnte erst nach Reduktion des fetalen Kälberserums (FCS) im Medium erreicht werden, da die zu erwarteten Banden im SDS- Gel durch große Proteinmengen überlagert wurden und somit einen spezifischen Nachweis der Fusionsproteine nicht möglich war. Es wurde vermutet, dass es sich hier bei um Albumin (66 kDa) handelt, das im notwendigerweise zugesetzte fetale Kälberserum in größeren Mengen vorhanden ist. Durch die schrittweise Reduktion des FCS im Medium unter Berücksichtigung der Überlebensfähigkeit der Zellen konnte eine minimale Konzentration von 0,1% FCS im Kulturmedium erreicht werden (Abb. 3-11). Dabei konnte gezeigt werden, dass auch noch unter diesen Bedingungen eine vergleichbare Reningentranskription und Stimulierbarkeit der As4.1- Zellen unter dem Einsatz von 0,1% und 5% FCS haltigem Medium möglich war. Was die Arbeit von Klar und Kollegen bestätigt (Klar et al., 2002). Unter diesen Bedingungen konnte für pRenEGFP transfizierte As4.1- Zellen sowohl im Zelllysat als auch im Zellüberstand eindeutige ReninEGFP Banden nachgewiesen werden (Abb. 3-12). Für das Lysat das bereits beschriebene Bandenmuster und im Überstand konnte ein distinkte Bande gezeigt werden. Es ist davon auszugehen, dass es sich hierbei um die inaktive Form des Fusionsprotein ReninEGFP handelt, da lediglich 5% des Renins in seiner aktiven Form aus der As4.1 Zelle geschleust werden. Dies zeigte auch Sigmund und Kollegen 1990.

Die optische Überprüfung der Expression der Renin- Fusionsproteine erfolgte anhand der Lokalisation von EGFP und RenEGFP nach der Transfektion der As4.1 Zellen. Dabei zeigte sich, dass zwar die Abgrenzung des rein cytosolischen EGFP

von ReninEGFP, das sich aufgrund der Präsequenz in Endoplasmatischen Retikulum, Golgi Apparat und Vesikeln befand, optisch eindeutig erfolgen konnte (Abb.3-13; Abb.3-14), allerdings konnten keine distinkten Vesikel in den transfizierten Zellen beobachtet werden. Diesen Befund bestätigten die parallele Fixierung und Färbung der Zellen mit Anti- Renin Antikörpern (Abb.3-15). Dies wurde durchgeführt, um ausschließen zu können, dass das Phänomen der fehlenden Vesikelbildung nicht durch die Fusionsproteine selbst bedingt ist. Interessanter Weise zeigte die in vivo Färbung des Trans- Golgi- Bereichs (Abb.3-16) eine auffallend ähnliche strukturelle Verteilung, wie die Verteilung der ReninEGFP Fusionsproteine. Dies legte die Vermutung nahe, dass eine Anhäufung von Renin im Trans- Golgi- Netzwerks (TGN) oder in dessen unmittelbarer Nähe stattfindet. Taugner und Kollegen (Taugner and Metz, 1986; Taugner et al., 1986a; Taugner and Hackenthal, 1988) zeigten, dass Prorenin in „unreifen“ und damit nur mäßig verdichteten Vesikelstrukturen in der Nähe des TGN beobachtet werden konnte. Zusätzlich zu diesen Befunden untermauern die Beobachtungen von Sigmund et al. (1990) die aufgestellte Hypothese, da sie zeigen konnten, dass As4.1 Zellen lediglich 5% Renin und dementsprechenden 95% Prorenin ausschleusen. Das würde bedeuten, dass viele kleine Vesikel konstitutiv aus der Zelle fließen, was auf Grund der Autofluoreszenz der Zelle strukturell nicht aufgelöst werden kann. Es ist deshalb notwendig die As4.1 Zelllinie soweit zu optimieren, dass eine verbesserte Ausbildung der Reninvesikel erfolgen kann.

2.2 Begünstigen der Reninvesikelbildung

Da die As4.1 Zellen durch ihre SV40 T Antigen Immortalisierung (Sigmund et al., 1990) einem ständigen Teilungsdruck unterliegen, lag die Vermutung nahe, dass die Ursache für die verringerte Vesikelbildung gegenüber den nativen JG- Zellen in diesem Aspekt zu suchen ist.

Es ist bekannt, dass sekretorische Proteine, zu denen auch Renin zählt, eine bestimmte Transittime auf ihrem Weg vom TGN zur Zellmembran benötigen, im Gegensatz zu Proteinen, die konstitutiv von der Zelle ausgeschleust werden (Burgess and Kelly, 1987). Diese Zeit ermöglicht eine weiterführende Prozessierung

der entsprechenden Proteine durch Enzyme in den Vesikeln und eine damit oft einhergehende „Verdichtung“ der Vesikel, was zu optisch besser auflösbaren Strukturen führt. Der enorm hohe Teilungsdruck der As4.1 Zellen könnte also der Grund sein, dass die benötigte Transittime der Vesikel nicht gewährleistet werden kann. Was letztendlich zu einer unvollständigen Reifung der Reninvesikel führen würde und damit auch zum einen die Menge an aktivem Renin, dass aus der Zelle ausgeschleust wird nur sehr klein sein kann und zum anderen eine Verdichtung der Vesikel nur schlecht beobachtet werden kann. Dafür sprechen auch Befunde von Sigmund und Kollegen 1990, die wie oben bereits erwähnt zeigten, dass lediglich 5% des ausgeschleusten Renins aktiv ist. Kurtz und Schweda postulierten ebenfalls, dass es verschiedene Renin- Pools gibt, die durch den entsprechenden Stimulus zur Sekretion gebracht werden können (Kurtz and Schweda, 2006).

Durch den Einsatz von Roscovitine und Olomoucine – beides bekannte pharmakologische Zellzyklus Inhibitoren- konnte die Teilungsrate der As4.1 Zellen herabgesetzt werden und gleichzeitig die Darstellung der Vesikelbildung erreicht werden. Beide führen zu einem Arrest der Zellen in der G1- Phase, was zunächst durch Erstellen einer Wachstumskurve (nicht gezeigte Daten), bestätigt werden konnte. Der entscheidende Nachweis erfolgte mittels der Quantifizierung der CyclinA2 mRNA Abundanz (Abb.3-17), wobei sich Olomoucine als wesentlich effektiver herausstellte und daher in allen weiteren Versuchen auf den Einsatz von Roscovitine verzichtet wurde.

Da Cycline während des Zellzyklus periodisch in den unterschiedlichen Phasen exprimiert werden lassen sie aufgrund ihrer Abundanz Rückschlüsse bezüglich der jeweiligen Zellzyklus- Stadiums zu (Sherr, 1993; Evans et al., 1983). Daher fiel für den Nachweis die Wahl auf besagtes CyclinA2, dessen Konzentration erst Ende der G1- Phase langsam zunimmt und in der G2- Phase seinen Höhepunkt erreicht. Der Nachweis der CyclinA2 mRNA als Proliferationsmarker wurde durch die Befunde von Yasmeen und Kollegen untermauert (Yasmeen et al., 2003). Die mit Olomoucine behandelten Zellen zeigten in der vorliegenden Arbeit gegenüber den Kontrollzellen eine signifikant verminderte CyclinA2 mRNA Abundanz um 75% (Abb.3-17), was wiederum durch die Befunde von Arooz und Kollegen gestützt wurde. Sie konnten

ebenfalls in Zellkulturextrakten zeigen, dass die absolute Konzentration an CyclinA2 in der G1- Phase um 75% niedriger war als in der G2- Phase (Arooz et al., 2000).

Die Bestimmung der Renin mRNA Abundanz unter dem Einfluss von Olomoucine zeigte allerdings, dass diese gegenüber den Kontrollzellen ebenfalls erniedrigt war (Abb.3-18). Weiter führende Versuche bewiesen, dass die Regulation der Renin mRNA Transkription der Zellen durch klassische Manöver (Abb.3-19), im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollzellen (Abb.3-20) aber erfolgreich durchgeführt werden konnte. Diese Tatsache wurde als Zeichen einer normal funktionierenden Zelle gewertet die lediglich in ihrer Reningentranskription leicht eingeschränkt ist, aber deren Regulationsmaschinerie auf niedrigerem Niveau in bekannter Weise funktionsfähig ist. Es kann angenommen werden, dass die Transkription einzelner Gene und damit auch das Reningen durch die Arretierung der Zellen in der G1- Phase beeinträchtigt wurde. In der Literatur finden sich mehrer Hinweise, die diese Hypothese bestätigen, da der CyclinA2/CDK2 Komplex bei der Aktivierung verschiedenster Transkriptionsfaktoren eine wichtige Rolle spielen kann (Fischer, 2004; Haidweger et al., 2001). Da, wie die eigenen Befunde zeigen, sowohl die Abundanz der CyclinA2 mRNA und damit auch Protein Konzentration des Cyclins, als auch die Hemmung der CDK2 direkt durch Olomoucine betroffen ist, ist es sehr wahrscheinlich, dass im verminderten Zusammenspiel von Cyclin und CDK die Ursache für die verringerte Transkription des Renins zu finden ist.

Die Bestimmung der Sekretionsraten von Renin und Prorenin (Abb.3-21) zeigte, dass der Anteil aktiven Renins um einen Faktor 2 gegenüber den unbehandelten Zellen gestiegen ist. Betrachtet man dies unter dem Aspekt, dass die Reningentranskription unter Olomoucine um einen Faktor 5 (Abb.3-18) erniedrigt ist, lässt das den Schluss zu, dass durch die Arretierung des Zellzyklus eine drastische Erhöhung der endogenen Aktivierung von Renin und der Reninsekretionsrate erreicht werden konnte. Nicht ganz auszuschließen ist hier, dass eventuell auch zusätzlich eine Erhöhung der Renin mRNA Stabilität erfolgte.

Die vorliegenden Sekretionsdaten lieferten ja bereits die ersten Hinweise auf eine gesteigerte endogene Aktivierung des Renins in As4.1 Zellen durch die Arretierung des Zellzyklus. Durch eine Lebendfärbung der Zellen konnte die verbesserte Vesikelbildung und -verteilung auch optisch gezeigt werden. Als Farbstoff wurde hier das azidotrophe Fluophor Quinacrine gewählt. Es konnte damit eindeutig gezeigt

werden, dass die Reninvesikelbildung per se und deren Verteilung, im direkten Vergleich der Kontrollzellen und der Olomoucine behandelten Zellen, positiv beeinflusst werden konnte. (Abb.3-22;Abb.3-23). Diese Daten wurden zum einen durch Peti-Peterdi und Kollegen bestätigt, die zeigen konnten, dass Quinacrine tatsächlich in sauren Organellen akkumuliert und Reningranulen färbt (Peti-Peterdi et al., 2004). Zum anderen wurden die erhobenen Befunde auch durch die zusätzliche spezifische Färbung der Reningranulen in fixierten Zellen abgesichert (Abb. 24; Abb.25). Diese zeigten, wie die Lebendfärbungen, erstmals eine distinkte Reninvesikelbildung im Cytoplasma der Zellen und nicht mehr lediglich eine Anhäufung von Renin im Bereich des TGN. Dieses Phänomen wurde dementsprechend als Bestätigung der Hypothese gewertet, dass durch den Einsatz des Zellzyklusinhibitors Olomoucine die Reninvesikelbildung und damit einhergehend auch die Reifung des Proteins Renin im Zuge der intrazellulären Reninprozessierung im vorliegenden in- vitro System verbessert werden konnte.

Abschließend konnte in diesem Zusammenhang auch gezeigt werden, dass die Transfektion der Zellen mit pRenEGFP und dem anschließenden Einsatz von Olomoucine zu einer nachweislichen Reninvesikelbildung führt. Die ReninEGFP Fusionsproteine konnten mit Hilfe des LSM 510 eindeutig in vesikulären Strukturen gezeigt werden.

Es kann also festgehalten werden, dass die Grundvoraussetzungen, die Etablierung eines in- vitro Systems, für weitere Untersuchungen der intrazellulären Reninprozessierung im Zuge dieser Arbeit geschaffen wurden.

V Zusammenfassung

Obwohl bereits viele Teilaspekte der zellulären Reninprozessierung durch in- vitro und in- vivo Untersuchungen beantwortet wurden, blieb die Frage nach der Rolle der Glykosylierung für die endogene Aktivierung des Renin bislang offen. Dies ist sicherlich auch darauf zurückzuführen, dass bis heute kein Modell sowohl für optische als auch für biochemische Untersuchungen der Reninprozessierung zur Verfügung steht.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es zum einen durch gezieltes Verpaaren von ausschließlich REN1 (glykosyliert) und REN2 (unglykosylierte) exprimierenden Mäusen ein in- vivo Modell zu etablieren, mit dessen Hilfe die intrazelluläre Prozessierung und Freisetzung von Renin in Abhängigkeit von dem jeweiligen Glykosylierungszustand des Renins charakterisiert werden kann. Dadurch konnte gezeigt werden, dass unter normotensiven Bedingungen die aktive Plasminogenkonzentration der homozygoten REN2- Tiere signifikant gegenüber den REN1- Tieren erniedrigt ist, aber gleichzeitig in diesen Tieren eine erhöhte Renin mRNA Expression vorliegt. In chronischen Stimulationsmanövern konnte sowohl in REN1-, REN1/ REN2- und REN2- Mäusen eine Erhöhung der Renin mRNA Expression und eine Steigerung Plasminogenaktivität - wenn auch auf unterschiedlichen Niveau - erreicht werden kann. Die Erhöhung der Sekretion von aktiven Renin in REN2- Mäusen fällt nach Kurzzeit- Stimulation bereits gegenüber den REN1- und REN1/ REN2- Mäusen deutlich geringer aus. Anhand der isoliert perfundierten Niere konnte gezeigt werden, dass selbst nach Stimulation kein aktives Renin aus den Nieren von REN2 Mäusen freigesetzt wird, sehr wohl aber aus Nieren von REN1 und REN1/REN2 Tieren. Es konnten demnach erstmals, im Zuge dieser Promotionsarbeit, gezeigt werden, dass das aus der Niere sezernierte unglykosylierte Renin2 bei chronischen Bedingungen die Funktion des glykosylierten Renins übernehmen kann, jedoch nicht bei schnellen, kurzzeitigen Stimulationen des RAAS. Gleichzeitig wurde damit die Notwendigkeit der

Glykosylierung des Renins für die Freisetzung aktiven Renins aus der juxtaglomerulären Zelle gezeigt.

In einem weiteren Teil der Arbeit war es möglich ein in- vitro Modell zu etablieren, mit dessen Hilfe die Reninprozessierung auf zellulärer Ebene zukünftig optisch und biochemisch untersucht werden kann. In Rahmen dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die immortalisierte JG- Zelllinie As4.1, die angefertigten Konstrukte nach transienter Transfektion verlässlich exprimiert und die Intensität der Fusionsproteine untereinander sich nicht aufgrund der eingeführten Mutationen unterscheiden. Der notwendige biochemische Nachweis der ReninEGFP- Fusionsproteine konnte durch optimierte Kulturbedingungen der Zellen sowohl im Lysat als auch im Überstand ermöglicht werden. Daher kann zukünftig- nach entsprechendem Bearbeiten der Proben- eine differenzierte Analyse der jeweiligen Stadien der intrazellulären Reninprozessierung erfolgen.

Des Weiteren sollte im Rahmen dieser Arbeit die Reninvesikelbildung für optische Untersuchungen optimiert werden. Dies gelang durch den Einsatz des Zellzyklusinhibitors Olomoucine, welcher die Teilungsrate der immortalisierten Zelle verlangsamt. Es konnte damit eine deutlich verbesserte Ausbildung von intrazellulären Reninvesikeln erreicht werden. Die verbesserte Darstellung konnte dabei sowohl in der lebenden Zelle durch den Einsatz des generierten Konstruktes pRenEGFP als auch an fixierten Zellen durch spezifische Renin HRP- Färbungen gezeigt werden. Durch dieses Manöver gelang es außerdem die Sekretionsrate aktiven Renins um einen Faktor 2 zu steigern. Die Voraussetzungen für die mikroskopischen Untersuchungen der Reninprozessierung konnten somit geschaffen werden.

VI Literaturverzeichnis

Arooz,T., Yam,C.H., Siu,W.Y., Lau,A., Li,K.K., and Poon,R.Y. (2000). On the concentrations of cyclins and cyclin-dependent kinases in extracts of cultured human cells. *Biochemistry* 39, 9494-9501.

Bader,M. and Ganten,D. (2000). Regulation of renin: new evidence from cultured cells and genetically modified mice. *J. Mol. Med.* 78, 130-139.

Barajas,L. (1979). Anatomy of the juxtaglomerular apparatus. *Am. J. Physiol* 237, F333-F343.

Beavo,J.A. (1995). Cyclic nucleotide phosphodiesterases: functional implications of multiple isoforms. *Physiol Rev.* 75, 725-748.

Bing,J. and Poulsen,K. (1971). The renin system in mice. Effects of removal of kidneys or (and) submaxillary glands in different strains. *Acta Pathol. Microbiol. Scand. A* 79, 134-138.

Bing,J. and Poulsen,K. (1975). Different effects on renal and submaxillary renin release after blockade of the renin system in mice. *Acta Pathol. Microbiol. Scand. [A]* 83, 733-736.

Bing,J., Poulsen,K., Hackenthal,E., Rix,E., and Taugner,R. (1980). Renin in the submaxillary gland: a review. *J. Histochem. Cytochem.* 28, 874-880.

Burgess,T.L. and Kelly,R.B. (1987). Constitutive and regulated secretion of proteins. *Annu. Rev. Cell Biol.* 3, 243-293.

Campbell,D.J. (1996). Endogenous angiotensin II levels and the mechanism of action of angiotensin-converting enzyme inhibitors and angiotensin receptor type 1 antagonists. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol Suppl* 3, S125-S131.

Campbell,D.J. (1987). Circulating and tissue angiotensin systems. *J. Clin. Invest* 79, 1-6.

Carey,R.M., McGrath,H.E., Pentz,E.S., Gomez,R.A., and Barrett,P.Q. (1997). Biomechanical coupling in renin-releasing cells. *J. Clin. Invest* 100, 1566-1574.

Castrop,H., Huang,Y., Hashimoto,S., Mizel,D., Hansen,P., Theilig,F., Bachmann,S., Deng,C., Briggs,J., and Schnermann,J. (2004a). Impairment of tubuloglomerular feedback regulation of GFR in ecto-5'-nucleotidase/CD73-deficient mice. *J. Clin. Invest* 114, 634-642.

Castrop,H., Schweda,F., Mizel,D., Huang,Y., Briggs,J., Kurtz,A., and Schnermann,J. (2004b). Permissive role of nitric oxide in macula densa control of renin secretion. *Am. J. Physiol Renal Physiol* 286, F848-F857.

- Catanzaro,D.F., Mullins,J.J., and Morris,B.J. (1983). The biosynthetic pathway of renin in mouse submandibular gland. *J. Biol. Chem.* 258, 7364-7368.
- Chalfie,M., Tu,Y., Euskirchen,G., Ward,W.W., and Prasher,D.C. (1994). Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* 263, 802-805.
- Chirgwin,J.M., Schaefer,I.M., Diaz,J.A., and Lalley,P.A. (1984). Mouse kidney renin gene is on chromosome one. *Somat. Cell Mol. Genet.* 10, 633-637.
- Chiu,T. and Reid,I.A. (1996). Role of cyclic GMP-inhibitable phosphodiesterase and nitric oxide in the beta adrenoceptor control of renin secretion. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 278, 793-799.
- Chu,W.N., Baxter,J.D., and Reudelhuber,T.L. (1990). A targeting sequence for dense secretory granules resides in the active renin protein moiety of human preprorenin. *Mol. Endocrinol.* 4, 1905-1913.
- Clark,A.F., Sharp,M.G., Morley,S.D., Fleming,S., Peters,J., and Mullins,J.J. (1997). Renin-1 is essential for normal renal juxtaglomerular cell granulation and macula densa morphology. *J. Biol. Chem.* 272, 18185-18190.
- Cormack,B.P., Valdivia,R.H., and Falkow,S. (1996). FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP). *Gene* 173, 33-38.
- Davis,J.O. and Freeman,R.H. (1976). Mechanisms regulating renin release. *Physiol Rev.* 56, 1-56.
- Dzau,V.J., Burt,D.W., and Pratt,R.E. (1988). Molecular biology of the renin-angiotensin system. *Am. J. Physiol* 255, F563-F573.
- Evans,T., Rosenthal,E.T., Youngblom,J., Distel,D., and Hunt,T. (1983). Cyclin: a protein specified by maternal mRNA in sea urchin eggs that is destroyed at each cleavage division. *Cell* 33, 389-396.
- Faust,P.L., Chirgwin,J.M., and Kornfeld,S. (1987). Renin, a secretory glycoprotein, acquires phosphomannosyl residues. *J. Cell Biol.* 105, 1947-1955.
- Fischer,P.M. (2004). The use of CDK inhibitors in oncology: a pharmaceutical perspective. *Cell Cycle* 3, 742-746.
- Friis,U.G., Jensen,B.L., Aas,J.K., and Skott,O. (1999). Direct demonstration of exocytosis and endocytosis in single mouse juxtaglomerular cells. *Circ. Res.* 84, 929-936.
- Friis,U.G., Jensen,B.L., Sethi,S., Andreasen,D., Hansen,P.B., and Skott,O. (2002). Control of renin secretion from rat juxtaglomerular cells by cAMP-specific phosphodiesterases. *Circ. Res.* 90, 996-1003.
- Fritz,L.C., Haidar,M.A., Arfsten,A.E., Schilling,J.W., Carilli,C., Shine,J., Baxter,J.D., and Reudelhuber,T.L. (1987). Human renin is correctly processed and targeted to the regulated secretory pathway in mouse pituitary AtT-20 cells. *J. Biol. Chem.* 262, 12409-12412.

- Fuchs,S., Germain,S., Philippe,J., Corvol,P., and Pinet,F. (2002). Expression of renin in large arteries outside the kidney revealed by human renin promoter/LacZ transgenic mouse. *Am. J. Pathol.* 161, 717-725.
- Fyhrquist,F. and Puutula,L. (1978). Effect of temperature on plasma renin samples. *Clin. Chem.* 24, 1202-1204.
- Grunberger,C., Obermayer,B., Klar,J., Kurtz,A., and Schweda,F. (2006). The calcium paradoxon of renin release: calcium suppresses renin exocytosis by inhibition of calcium-dependent adenylate cyclases AC5 and AC6. *Circ. Res.* 99, 1197-1206.
- Hackenthal,E., Paul,M., Ganten,D., and Taugner,R. (1990). Morphology, physiology, and molecular biology of renin secretion. *Physiol Rev.* 70, 1067-1116.
- Haidweger,E., Novy,M., and Rotheneder,H. (2001). Modulation of Sp1 activity by a cyclin A/CDK complex. *J. Mol. Biol.* 306, 201-212.
- Hansen,P.B., Yang,T., Huang,Y., Mizel,D., Briggs,J., and Schnermann,J. (2004). Plasma renin in mice with one or two renin genes. *Acta Physiol Scand.* 181, 431-437.
- Hirose,S., Kim,S., Miyazaki,H., Park,Y.S., and Murakami,K. (1985). In vitro biosynthesis of human renin and identification of plasma inactive renin as an activation intermediate. *J. Biol. Chem.* 260, 16400-16405.
- Holm,I., Ollo,R., Panthier,J.J., and Rougeon,F. (1984). Evolution of aspartyl proteases by gene duplication: the mouse renin gene is organized in two homologous clusters of four exons. *EMBO J.* 3, 557-562.
- Holmer,S.R., Kaissling,B., Putnik,K., Pfeifer,M., Kramer,B.K., Riegger,G.A., and Kurtz,A. (1997). Beta-adrenergic stimulation of renin expression in vivo. *J. Hypertens.* 15, 1471-1479.
- Jacobsen,L.B., Calvin,S.A., Colvin,K.E., and Wright,M. (2004). FuGENE 6 Transfection Reagent: the gentle power. *Methods* 33, 104-112.
- Jensen,B.L., Kramer,B.K., and Kurtz,A. (1997). Adrenomedullin stimulates renin release and renin mRNA in mouse juxtaglomerular granular cells. *Hypertension* 29, 1148-1155.
- JOHNSON,F.H., SHIMOMURA,O., and SAIGA,Y. (1962). Action of cyanide on Cypridina luciferin. *J. Cell Comp Physiol* 59, 265-272.
- Jones,C.A., Petrovic,N., Novak,E.K., Swank,R.T., Sigmund,C.D., and Gross,K.W. (1997). Biosynthesis of renin in mouse kidney tumor As4.1 cells. *Eur. J. Biochem.* 243, 181-190.
- Keeton,T.K. and Campbell,W.B. (1980). The pharmacologic alteration of renin release. *Pharmacol. Rev.* 32, 81-227.
- Kim,H.S., Maeda,N., Oh,G.T., Fernandez,L.G., Gomez,R.A., and Smithies,O. (1999). Homeostasis in mice with genetically decreased angiotensinogen is primarily by an increased number of renin-producing cells. *J. Biol. Chem.* 274, 14210-14217.

- King, J.A., Lush, D.J., and Fray, J.C. (1993). Regulation of renin processing and secretion: chemiosmotic control and novel secretory pathway. *Am. J. Physiol* 265, C305-C320.
- Klar, J., Sandner, P., Muller, M.W., and Kurtz, A. (2002). Cyclic AMP stimulates renin gene transcription in juxtaglomerular cells. *Pflugers Arch.* 444, 335-344.
- Kon, Y. and Endoh, D. (1999). Renin in exocrine glands of different mouse strains. *Anat. Histol. Embryol.* 28, 239-242.
- Kurtz, A. (1989). Cellular control of renin secretion. *Rev. Physiol Biochem. Pharmacol.* 113, 1-40.
- Kurtz, A., Della, B.R., Pfeilschifter, J., and Bauer, C. (1988a). Role of cGMP as second messenger of adenosine in the inhibition of renin release. *Kidney Int.* 33, 798-803.
- Kurtz, A., Gotz, K.H., Hamann, M., and Wagner, C. (1998). Stimulation of renin secretion by nitric oxide is mediated by phosphodiesterase 3. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 95, 4743-4747.
- Kurtz, A., Muff, R., Born, W., Lundberg, J.M., Millberg, B.I., Gnadinger, M.P., Uehlinger, D.E., Weidmann, P., Hokfelt, T., and Fischer, J.A. (1988b). Calcitonin gene-related peptide is a stimulator of renin secretion. *J. Clin. Invest* 82, 538-543.
- Kurtz, A., Pfeilschifter, J., Hutter, A., Buhrle, C., Nobiling, R., Taugner, R., Hackenthal, E., and Bauer, C. (1986). Role of protein kinase C in inhibition of renin release caused by vasoconstrictors. *Am. J. Physiol* 250, C563-C571.
- Kurtz, A. and Schweda, F. (2006). Osmolarity-induced renin secretion from kidneys: evidence for readily releasable renin pools. *Am. J. Physiol Renal Physiol* 290, F797-F805.
- Kurtz, A. and Wagner, C. (1998). Role of nitric oxide in the control of renin secretion. *Am. J. Physiol* 275, F849-F862.
- Kurtz, A. and Wagner, C. (1999). Cellular control of renin secretion. *J. Exp. Biol.* 202, 219-225.
- Lathe, R. (1996). Mice, gene targeting and behaviour: more than just genetic background. *Trends Neurosci.* 19, 183-186.
- Lush, D.J. and Fray, J.C. (1984). Steady-state autoregulation of renal blood flow: a myogenic model. *Am. J. Physiol* 247, R89-R99.
- Morris, B.J. (1992). Molecular biology of renin. I: Gene and protein structure, synthesis and processing. *J. Hypertens.* 10, 209-214.
- Muller, M.W., Todorov, V., Kramer, B.K., and Kurtz, A. (2002). Angiotensin II inhibits renin gene transcription via the protein kinase C pathway. *Pflugers Arch.* 444, 499-505.

- Mullins,L.J., Payne,C.M., Kotelevtseva,N., Brooker,G., Fleming,S., Harris,S., and Mullins,J.J. (2000). Granulation rescue and developmental marking of juxtaglomerular cells using "piggy-BAC" recombination of the mouse ren locus. *J. Biol. Chem.* 275, 40378-40384.
- Ortiz-Capisano,M.C., Ortiz,P.A., Harding,P., Garvin,J.L., and Beierwaltes,W.H. (2007). Decreased intracellular calcium stimulates renin release via calcium-inhibitable adenylyl cyclase. *Hypertension* 49, 162-169.
- Palade,G. (1975). Intracellular aspects of the process of protein synthesis. *Science* 189, 347-358.
- Panthier,J.J., Foote,S., Chambraud,B., Strosberg,A.D., Corvol,P., and Rougeon,F. (1982). Complete amino acid sequence and maturation of the mouse submaxillary gland renin precursor. *Nature* 298, 90-92.
- Paul,M., Nakamura,N., Pratt,R.E., and Dzau,V.J. (1988). Glycosylation influences intracellular transit time and secretion rate of human prorenin in transfected cells. *J. Hypertens. Suppl* 6, S487-S489.
- Pentz,E.S., Lopez,M.L., Kim,H.S., Carretero,O., Smithies,O., and Gomez,R.A. (2001). Ren1d and Ren2 cooperate to preserve homeostasis: evidence from mice expressing GFP in place of Ren1d. *Physiol Genomics* 6, 45-55.
- Peti-Peterdi,J., Fintha,A., Fuson,A.L., Tousson,A., and Chow,R.H. (2004). Real-time imaging of renin release in vitro. *Am. J. Physiol Renal Physiol* 287, F329-F335.
- Petrovic,N., Kane,C.M., Sigmund,C.D., and Gross,K.W. (1997). Downregulation of renin gene expression by interleukin-1. *Hypertension* 30, 230-235.
- Pfeilschifter,J., Kurtz,A., and Bauer,C. (1985). Inhibition of renin secretion by platelet activating factor (acetylgluceryl ether phosphorylcholine) in cultured rat renal juxtaglomerular cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 127, 903-910.
- Phillips,M.I., Speakman,E.A., and Kimura,B. (1993). Levels of angiotensin and molecular biology of the tissue renin angiotensin systems. *Regul. Pept.* 43, 1-20.
- Pietri,L., Bloch-Faure,M., Belair,M.F., Sanford,L.P., Doetschman,T., Menard,J., Bruneval,P., and Meneton,P. (2002). Altered renin synthesis and secretion in the kidneys of heterozygous mice with a null mutation in the TGF-beta(2) gene. *Exp. Nephrol.* 10, 374-382.
- Prasher,D.C., Eckenrode,V.K., Ward,W.W., Prendergast,F.G., and Cormier,M.J. (1992). Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein. *Gene* 111, 229-233.
- Pratt,R.E., Carleton,J.E., Roth,T.P., and Dzau,V.J. (1988a). Evidence for two cellular pathways of renin secretion by the mouse submandibular gland. *Endocrinology* 123, 1721-1727.

Pratt,R.E., Flynn,J.A., Hobart,P.M., Paul,M., and Dzau,V.J. (1988b). Different secretory pathways of renin from mouse cells transfected with the human renin gene. *J. Biol. Chem.* 263, 3137-3141.

Presley,J.F. (2005). Imaging the secretory pathway: the past and future impact of live cell optical techniques. *Biochim. Biophys. Acta* 1744, 259-272.

Reudelhuber, TL., Mercure, C, Ramla, D, Methot, D, and and Postnov, AY. Hypertension , 1621-1636. 1995. New York, Raven Press.
Ref Type: Generic

Ritthaler,T., Scholz,H., Ackermann,M., Riegger,G., Kurtz,A., and Kramer,B.K. (1995). Effects of endothelins on renin secretion from isolated mouse renal juxtaglomerular cells. *Am. J. Physiol* 268, F39-F45.

Rothwell,V., Kosowski,S., Hadjilambris,O., Baska,R., and Norman,J. (1993). Glycosylation of active human renin is necessary for secretion: effect of targeted modifications of Asn-5 and Asn-75. *DNA Cell Biol.* 12, 291-298.

Schekman,R. (1992). Genetic and biochemical analysis of vesicular traffic in yeast. *Curr. Opin. Cell Biol.* 4, 587-592.

Schlatter,E., Salomonsson,M., Persson,A.E., and Greger,R. (1989). Macula densa cells sense luminal NaCl concentration via furosemide sensitive Na⁺2Cl-K⁺ cotransport. *Pflugers Arch.* 414, 286-290.

Schnermann,J., Traynor,T., Yang,T., Arend,L., Huang,Y.G., Smart,A., and Briggs,J.P. (1998). Tubuloglomerular feedback: new concepts and developments. *Kidney Int. Suppl* 67, S40-S45.

Scholz,H., Gotz,K.H., Hamann,M., and Kurtz,A. (1994). Differential effects of extracellular anions on renin secretion from isolated perfused rat kidneys. *Am. J. Physiol* 267, F1076-F1081.

Scholz,H., Kramer,B.K., Hamann,M., Gotz,K.H., and Kurtz,A. (1995). Effects of endothelins on renin secretion from rat kidneys. *Acta Physiol Scand.* 155, 173-182.

Schweda,F., Klar,J., Narumiya,S., Nusing,R.M., and Kurtz,A. (2004). Stimulation of renin release by prostaglandin E2 is mediated by EP2 and EP4 receptors in mouse kidneys. *Am. J. Physiol Renal Physiol* 287, F427-F433.

Schweda,F. and Kurtz,A. (2004). Cellular mechanism of renin release. *Acta Physiol Scand.* 181, 383-390.

Schweda,F., Wagner,C., Kramer,B.K., Schnermann,J., and Kurtz,A. (2003). Preserved macula densa-dependent renin secretion in A1 adenosine receptor knockout mice. *Am. J. Physiol Renal Physiol* 284, F770-F777.

Sherr,C.J. (1993). Mammalian G1 cyclins. *Cell* 73, 1059-1065.

Sigmund,C.D. and Gross,K.W. (1991). Structure, expression, and regulation of the murine renin genes. *Hypertension* 18, 446-457.

- Sigmund, C.D., Okuyama, K., Ingelfinger, J., Jones, C.A., Mullins, J.J., Kane, C., Kim, U., Wu, C.Z., Kenny, L., Rustum, Y., and . (1990). Isolation and characterization of renin-expressing cell lines from transgenic mice containing a renin-promoter viral oncogene fusion construct. *J. Biol. Chem.* 265, 19916-19922.
- Skott, O. (1988). Effects of osmolality and calcium on renin release from superfused rat glomeruli treated with nigericin or monensin. *Pflugers Arch.* 412, 503-508.
- Skott, O. (1986). Episodic release of renin from single isolated superfused rat afferent arterioles. *Pflugers Arch.* 407, 41-45.
- Tamura, K., Umemura, S., Fukamizu, A., Ishii, M., and Murakami, K. (1995). Recent advances in the study of renin and angiotensinogen genes: from molecules to the whole body. *Hypertens. Res.* 18, 7-18.
- Taugner, R., Buhle, C.P., Hackenthal, E., Mannek, E., and Nobiling, R. (1984a). Morphology of the juxtaglomerular apparatus and secretory mechanisms. *Contrib. Nephrol.* 43, 76-101.
- Taugner, R., Buhle, C.P., and Nobiling, R. (1984b). Ultrastructural changes associated with renin secretion from the juxtaglomerular apparatus of mice. *Cell Tissue Res.* 237, 459-472.
- Taugner, R. and Hackenthal, E. (1988). On the character of the secretory granules in juxtaglomerular epithelioid cells. *Int. Rev. Cytol.* 110, 93-131.
- Taugner, R. and Metz, R. (1986). Development and fate of the secretory granules of juxtaglomerular epithelioid cells. *Cell Tissue Res.* 246, 595-606.
- Taugner, R., Murakami, K., and Kim, S.J. (1986a). Renin activation in juvenile secretory granules? Immunocytochemical experiments with an antiserum directed against the prosegment of human renin. *Histochemistry* 85, 107-109.
- Taugner, R., Yokota, S., Buhle, C.P., and Hackenthal, E. (1986b). Cathepsin D coexists with renin in the secretory granules of juxtaglomerular epithelioid cells. *Histochemistry* 84, 19-22.
- Thomas, N. (2007). Fluorescent proteins and engineered cell lines. *Methods Mol. Biol.* 356, 165-187.
- Todorov, V., Muller, M., Schweda, F., and Kurtz, A. (2002). Tumor necrosis factor- α inhibits renin gene expression. *Am. J. Physiol Regul. Integr. Comp Physiol* 283, R1046-R1051.
- Toffelmire, E.B., Slater, K., Corvol, P., Menard, J., and Schambelan, M. (1989). Response of plasma prorenin and active renin to chronic and acute alterations of renin secretion in normal humans. Studies using a direct immunoradiometric assay. *J. Clin. Invest* 83, 679-687.
- Tsien, R.Y. (1998). The green fluorescent protein. *Annu. Rev. Biochem.* 67, 509-544.
- Vander, A.J. (1967). Control of renin release. *Physiol Rev.* 47, 359-382.

Villard,E., Lalau,J.D., van,H., I, Derkx,F.H., Houot,A.M., Pinet,F., Corvol,P., and Soubrier,F. (1994). A mutant renin gene in familial elevation of prorenin. *J. Biol. Chem.* 269, 30307-30312.

Wagner,C., Hinder,M., Kramer,B.K., and Kurtz,A. (1999). Role of renal nerves in the stimulation of the renin system by reduced renal arterial pressure. *Hypertension* 34, 1101-1105.

Wagner,C. and Kurtz,A. (1998). Regulation of renal renin release. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* 7, 437-441.

Wagner,C., Pfeifer,A., Ruth,P., Hofmann,F., and Kurtz,A. (1998). Role of cGMP-kinase II in the control of renin secretion and renin expression. *J. Clin. Invest* 102, 1576-1582.

Yasmeen,A., Berdel,W.E., Serve,H., and Muller-Tidow,C. (2003). E- and A-type cyclins as markers for cancer diagnosis and prognosis. *Expert. Rev. Mol. Diagn.* 3, 617-633.

VII Anhang

1 Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µL	Mikroliter
µmol	Mikromol
Abb.	Abbildung
AC	Adenylatzyklase
ACE	Angiotensin converting Enzym
Amp	Ampicillin
Ang I	Angiotensin I
Ang II	Angiotensin II
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
cAMP	zyklischen Adenosinmonophosphat
cDNA	copy Desoxyribonukleinsäure
cGMP	zyklischen Guanosinmonophosphat
cpm	counts per minute
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	Dulbecco`s modified Eagle Medium
DNase	Desoxyribonuklease
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTT	Dithiotreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EtOH	Ethanol
FCS	fetales Kälberserum
g	Erdbeschleunigung
g	Gramm

GC	Guanylatzyklase
h	Stunde
JG	juxtaglomerular
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
LB	Luria Broth
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
NO	Stickstoffmonoxid
p	Irrtumswahrscheinlichkeit
PC	Phospholipase C
PKA	Proteinkinase A
PRC	Plasmareninkonzentration
RIA	Radioimmunoassay
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
sec	Sekunde
SEM	Standardabweichung des Mittelwerts
SV40	Simian Virus 40
üN	über Nacht

2 Publikationen

1: Klar J, Sigl M, **Obermayer B**, Schweda F, Krämer BK, Kurtz A.

Calcium inhibits renin gene expression by transcriptional and posttranscriptional mechanisms. Hypertension. 2005 Dec;46(6):1340-6.

2: Grünberger C, **Obermayer B**, Klar J, Kurtz A, Schweda F.

The calcium paradoxon of renin release: calcium suppresses renin exocytosis by inhibition of calcium-dependent adenylate cyclases AC5 and AC6.

Circ Res. 2006 Nov 24;99(11):1197-206.

3: Breunig M, Lungwitz U, Liebl R, Klar J, **Obermayer B**, Blunk T, Goepferich A.

Mechanistic insights into linear polyethylenimine-mediated gene transfer. Biochim Biophys Acta. 2007 Feb;1770(2):196-205.

3 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denjenigen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben:

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Armin Kurtz für die Vergabe des interessanten Themas und das Bereitstellen exzellenter Forschungsbedingungen. Vor allem möchte ich mich für die langjährige Unterstützung bedanken, die mir den Abschluss dieser Dissertation ermöglicht hat.

Herrn Prof. Dr. Frank Schweda möchte ich für seine Hilfsbereitschaft bei der Bewältigung des Laboralltags und dafür, dass er sich immer Zeit für die Beantwortung von Fragen genommen hat danken. Im Besonderen bei der Erhebung und Diskussion der in vivo Daten. Vielen Dank!

Bei Frau Dr. Miriam Breunig möchte ich mich für die äußerst kompetente Einführung in die Welt der konfokalen Mikroskopie und der Durchflusszytometrie bedanken und auch für das unermüdliche Beantworten meiner Fragen diesbezüglich. Mein Dank gilt in diesem Zusammenhang auch Frau Renate Liebl und im Besonderen Herrn Prof. Dr. Achim Göpferich, der diese Zusammenarbeit ermöglichte.

Frau Susanne Fink danke ich recht herzlich für die, für mich sehr wichtige, produktive Unterstützung in den letzten Monaten am Lehrstuhl und für die schöne, gemeinsame Zeit im Labor.

Allen Angehörigen des Lehrstuhles möchte ich für das nette Arbeitsklima und die kollegiale Unterstützung bei der Bewältigung des Laboralltags danken- .Diese Zeit wird mir stets in guter Erinnerung bleiben.

Mein größter Dank gilt Jürgen!

4 Eidesstattliche Erklärung

Ich, Birgit Klar geb. Obermayer, erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als den angegebenen Hilfsmitteln angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe des Literaturzitats gekennzeichnet. Diese Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

.....

Birgit Klar

Wuppertal,